

**В. Р. МИКРЯКОВ**

**Закономерности  
формирования приобретенного  
иммунитета у рыб**

1991

Академия наук СССР  
Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина

**В. Р. Микряков**  
**Закономерности формирования**  
**приобретенного иммунитета у рыб**

Academy of Sciences of the USSR  
I. D. Papanin Institute of Biology of Inland  
Waters

V. R. Mikryakov

Mechanism of the acquired immunity formation in  
fish

УДК 597:612.017 (28)+597—11 (28)

Микряков В. Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. — Рыбинск, 1990. — 00 с.

Монография посвящена описанию механизмов и факторов иммунологической перестройки организма рыб после иммунизации. На основе многолетних исследований факторов активно приобретенного иммунитета рыб к возбудителям бактериальных болезней и литературных данных автором подробно рассматриваются физиологические и морфологические основы распознавания, разрушения антигена, синтеза антител и влияние температуры, рН воды, голодания, содержания в воде токсических соединений на процессы иммуногенеза. Сформулированы общие принципы формирования приобретенного иммунитета и регуляции функциональной активности иммунной системы рыб.

Рассчитана на специалистов в области сравнительной, инфекционной иммунологии, ихтиологии рыбоводства, а также для студентов и аспирантов. Библиогр. 361 назв. Ил. 33. Табл. 31.

Ответственный редактор *Б. И. Куперман*

© В. Р. Микряков

## **ВВЕДЕНИЕ**

Иммунитет рыб в настоящее время привлекает внимание широкого круга исследователей. Бурное развитие эти исследования получили за последние 10—15 лет. Повышенный интерес к проблемам иммунологии рыб обусловлен рядом причин: 1) необходимостью познания путей становления механизмов специфического иммунитета и оценкой их биологической роли в реализации процессов эволюции многоклеточных животных на разных этапах филогенеза; 2) поиском эффективных и целенаправленных способов регуляции динамики численности паразитов (в самом широком смысле этого слова) на хозяевах в связи с дестабилизацией системы хозяин-паразит и возникновением эпизоотий инфекционных и инвазионных болезней при интенсивных и индустриальных способах разведения рыб.

Иммунологические исследования на рыбах в настоящее время ведутся в широком плане и направлены на выяснение особенностей структурно-функциональной организации иммунной системы в плане сравнительной иммунологии (Лукьяненко, 1971, 1989; Галактионов, 1986; Вихман, 1989; Cooper, 1976; Marchalonis, 1977; Fänge, 1982; Zapata, 1983; Ruben, 1984; Ambrosius, 1985; Hodge, 1985; Reinish, Litman, 1989 и др.), установлении реакции иммунной системы на меняющиеся условия среды под воздействием антигенной нагрузки и определение механизмов и факторов иммунитета к инфекционным и инвазионным болезням, на разработку методов вакцинации иммунодиагностики (Лукьяненко, 1971, 1989; Микряков, 1976, 1978, 1984; Вихман, 1983; Балахнин и др., 1989; Anderson, 1974; Schaperclaus, 1979; Ahne, 1981; Dorson, 1981; Leeman, Brindeu, 1981; Anderson, Dixon, 1984;

Fijan, 1984; Horne et al., 1984; Paterson et al., 1985 и др.).

Проведенные исследования позволили установить общие для различных групп позвоночных животных и специфические для рыб черты строения и функционирования иммунной системы. У рыб впервые в ряду позвоночных появляется иммуноглобулиновая система распознавания «чужого» и развитая лимфоидная система, состоящая из совокупности лимфоидных органов (тимуса, селезенки) и скоплений лимфоидной ткани, расположенных в области различных органов (почки, пищевод, стенка кишечника, черепная полость, области сердца и т. п.). Исследованиями клеточных и молекулярных основ иммунного ответа определены физико-химические свойства иммуноглобулинов, комплемента, лизоцима,  $\alpha$ ,  $\beta$ -преципитинов, состав и структура иммуноцитов, осуществляющих функции распознавания, разрушения «чужого» и синтеза антител.

Итоги работ по иммунопрофилактике и иммунодиагностике позволили создать коммерческие вакцины и диагностические препараты для практики (Anhe, 1981; Bush, 1981; Anderson, Dixon, 1984; Fijan, 1984 и др.).

Следует отметить, что как фундаментальные вопросы иммунологии рыб, так и проблемы иммунопрофилактики наиболее интенсивно развиваются за рубежом (США, Япония, Канада, Франция, Норвегия, Германия и т. д.).

Несмотря на достигнутые успехи в деле познания структуры и функции иммунной системы рыб, роли гуморальных и клеточных факторов иммунитета в реализации защитных функций и адаптации рыб к меняющимся биотическим и абиотическим факторам среды, подробные сведения о которых можно найти в монографических изданиях (Лукьяненко, 1971, 1989; Anderson, 1974; Cooper, 1976; Marchalonis, 1977), многие вопросы, касающиеся характера взаимодействия иммунной системы с антигеном возбудителей инфекционных и инвазионных болезней, механизмов, регулирующих и осуществляющих процесс иммунологической перестройки организма, приводящих к формированию приобретенного иммунитета, остаются недостаточно изученными.

Между тем, интенсивная разработка специфических средств профилактики, поиск оптимальных условий вакцинации с целью достижения максимальной эффективности последствий иммунизации рыб не представляется воз-

мирования приобретенного иммунитета и факторов, влияющих на процессы иммунологической перестройки организма рыб. Следует отметить, что накопленные в литературе материалы в связи с исследованием приобретенного иммунитета рыб к инфекционным и инвазионным болезням, в большинстве своем имеют отрывочный характер, посвящены либо изучению отдельных иммунологических реакций (фагоцитоз, распределение антигена, синтез антител), либо изменению напряженности иммунитета рыб после вакцинации и т. д. Отсутствие обобщающих работ создает определенные трудности не только при разработке фундаментальных выводов инфекционной иммунологии, но и при подготовке специалистов и создании средств специфической профилактики.

Основываясь на результатах собственных многолетних исследований по изучению закономерностей иммунологической перестройки организма рыб и физиологических механизмов иммуногенеза после иммунизации рыб бактериальным антигеном и с учетом многочисленных литературных данных автором впервые предпринята попытка обобщить материалы исследований в виде монографии.

В книге на единой методической основе обобщены процессы иммуногенеза, которые определяют формирование активно приобретенного иммунитета рыб. В монографии детально рассматриваются вопросы распознавания, распределения, разрушения, элиминации и анаболизма антигена, клеточные основы а. т. телообразования, влияние различных факторов среды (температуры, кормления, рН воды, токсических веществ) на интенсивность проявления иммунологических реакций, анализируются механизмы и факторы усиления иммунологических функций и напряженности иммунитета рыб после иммунизации. Основной акцент при изложении материала сделан на описании активно приобретенного иммунитета рыб к бактериальной инфекции.

## Глава I. МЕТОДЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования послужили 7 видов рыб (щука *Esox lucius* (L.), плотва *Rutilus rutilus* (L.), лещ

карась *Carassius carassius* (L.), карп *Cyprinus carpio* (L.), окунь *Perca fluviatilis* (L.), являющихся представителями 7 родов из 3 семейств и отрядов (Берг, 1948; Никольский, 1971; Моисеев и др., 1981). Выбор их в качестве объектов изучения обусловлен тем, что они относятся к массовым в пресноводных экосистемах видам и имеют важное промысловое и рыбохозяйственное значение. Кроме того, некоторые из них (карп) являются основными и традиционными объектами рыбоводства в прудовых хозяйствах. Указанные виды отличаются между собой образом жизни, типом питания, временем нереста и т. д. Все виды ведут мирный образ жизни. По типу питания подразделяются на планктофагов (синец), бентофагов (лещ и карп), моллюскоедов (плотва) и эпифитофагов (карась). В соответствии с типом питания в рационе карповых преобладают либо планктонные беспозвоночные, либо кормовые организмы, обитающие в грунтах, либо растительные объекты (Максимова, 1974).

В зависимости от сроков нереста рыбы подразделяются на весенне — (щука, плотва, лещ, синец, окунь) и летне-нерестящиеся (карп, карась) виды (Берг, 1948; Никольский, 1971; Моисеев и др., 1981).

Материал собирали в 1964—1983 гг. в Рыбинском водохранилище и на экспериментальной прудовой базе «Сунога» ИБВВ АН СССР. Для оценки иммунологической реактивности рыбу отлавливали неводом, сетями и тралом. Экспериментальной базой для проведения опытов служили аквариальные лаборатории ихтиологии и физиологии водных животных, а также прудовая база института «Сунога».

Таблица 1

Количество рыб, использованных в опытах

Виды рыб	Распознавание антигена	Распределение и разрушение * антигена	Синтез антител	Напряженность иммунитета
Щука — <i>Esox lucius</i> (L.)	—	170	—	40
Плотва — <i>Rutilus rutilus</i> (L.)	—	295	—	250
Лещ — <i>Abramis brama</i> (L.)	—	2577	—	310
Синец — <i>Abramis ballerus</i> (L.)	—	351	—	270
Золотой карась — <i>Carassius carassius</i> (L.)	155	310	150	1100
Карп — <i>Cyprinus carpio</i> (L.)	120	590	580	1800
Окунь — <i>Perca fluviatilis</i> (L.)	—	160	—	70

Примечание.\* — о разрушении антигена судили по элиминации про-

Функционирование иммунной системы рыб изучали на клеточном, гуморальном, органном, организменном, популяционном и видовом уровнях организации. Иммунологическую реактивность оценивали по распознаванию, распределению, разрушению антигена в организме, синтезу антител и напряженности иммунитета (табл. 1). Исследование иммунологических функций проводили при воздействии на рыб бактериальным антигеном, гормонами надпочечников, разными температурами, низкими значениями рН, токсическими веществами (фенола) и в зависимости от исходного состояния организма и зараженности рыб паразитами.

### Определение антигенраспознающей функции

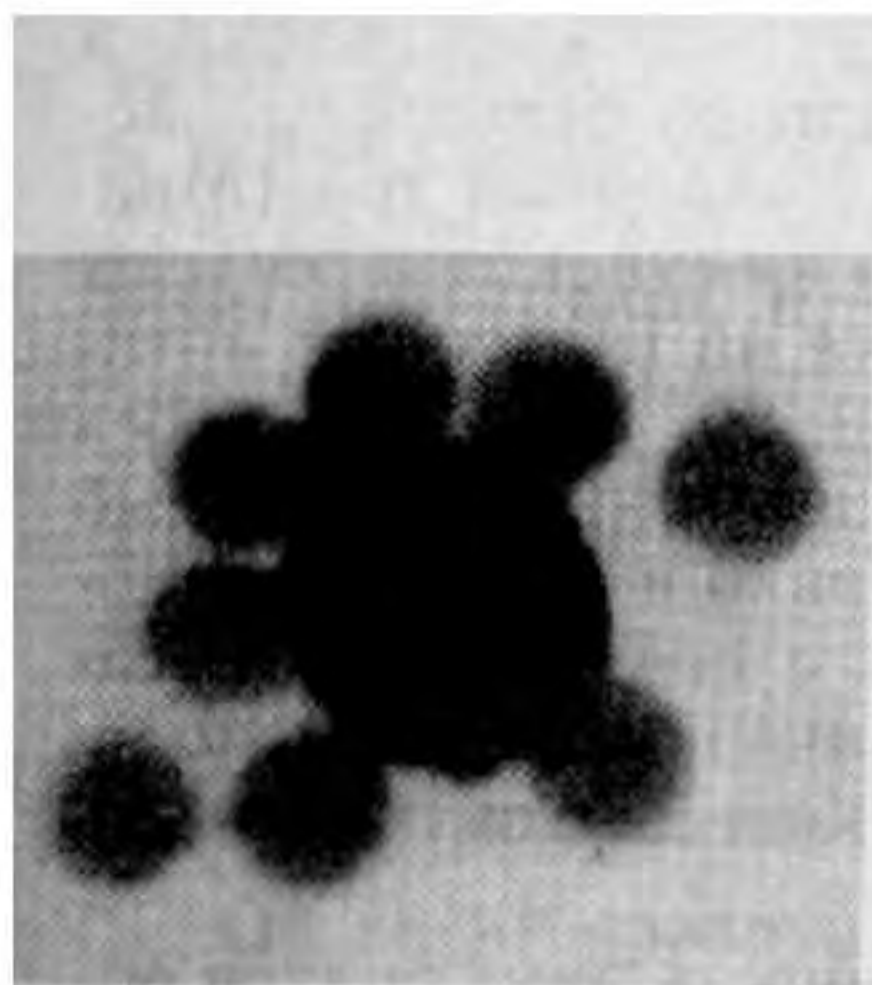
Антигенраспознающую или антигенреагирующую функцию иммунной системы рыб изучали *in vivo* и *in vitro* на уровне клеток. Для этого использовали методы иммуноцитoadгезии (Lewis et al., 1979) розеткообразования (Гришина, Мюллер, 1978), приспособленных нами для иммуноцитов рыб, цитологического анализа реакции иммунокомпетентных клеток (ИМК) в ответ на парентеральное введение бактерий. Морфофункциональные свойства антигенреагирующих клеток (АГРК) исследовали методами световой и электронной микроскопии после воздействия на них митогенами и ионами  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ .

Реакцию иммуноцитoadгезии определяли на лимфоцитах карпов и карасей. Лимфоциты выделяли из селезенки и почек в градиенте плотности фиколл-верографин (плотность раствора 1.075—1.076 г/мл) путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 30 мин. Взвесь лимфоцитов очищали трехкратным центрифугированием в растворе Хенкса или среде 199. Жизнеспособность клеток определяли в тесте с трипановым синим. Общее число клеток подсчитывали в камере Горяева. Опыты



фугирования. В опыт вносили  $10^5$  кл. лимфоцитов и  $40 \times 10^6$  микробных тел. Суточную культуру *Aeromonas punctata* выращивали на рыбопептонном агаре (РПА). Перед опытом трижды клетки отмывали физиологическим раствором путем центрифугирования при 8—10 тыс. об/мин. Лимфоциты с микроорганизмами инкубировали в течение 3 ч при температуре  $26^\circ\text{C}$ , затем осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 15 мин. Верхний надосадочный слой сливали, из клеток после их ресуспендирования в физиологическом растворе 0.5 мл готовили мазки. Высушенные на воздухе мазки фиксировали метанолом и окрашивали по Гимза—Романовскому (Гончаров, 1973). Учет реакции осуществляли под световым микроскопом, в 10 полях зрения. К АГРК относили иммуноциты с 5 и более прилипшими микроорганизмами.

Гетерогенность АГРК устанавливали по реакции розеткообразования (Гришина, Мюллер, 1978), где в качестве антигена использовали эритроциты барана и зимозан с комплементом. Сущность метода заключается в том, что лимфоциты одновременно инкубируются в среде 199 в присутствии эритроцитов барана (ЭБ) и комплекса зимозан-комплемент (КЗК). В зависимости от наличия антигенсвязывающих рецепторов на клеточной мембране они взаимодействуют либо с одним видом антигена (ЭБ или КЗК), либо с комплексом (ЭБ+КЗК). Данный метод, на лимфоцитах высших позвоночных (Петров, 1982), используется для определения их функциональной разнокачественности. В соответствии с характером взаимодействия лимфоциты теплокровных животных дифференцируются на 4 типа: Т, В, Д и О. При определении особенностей взаимодействия лимфоцитов с разными антигенами вместо комплемента морской свинки мы использовали свежую сыворотку крови леща. Опыты ставили с комплементом и без него. Лимфоциты рыб с ЭБ и КЗК (ЭБ+зимозан) инкубировали при температуре  $26^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Препараты окрашивали по Гимза—Романовскому. По характеру реагирования с чужеродными телами лимфоциты рыб разделили на 4 группы. К первой группе относили клетки, реагирующие только с ЭБ; ко второй — с частицами зимозана, к третьей — с ЭБ и зимозаном, а к четвертой — нулевые клетки, не вступающие в реакцию взаимодействия с антигенами



а



б



в



г

Рис. 1. Розеткообразующие клетки с эритроцитами барана (а), с химопсином (б), с химопсином + эритроцитами барана (в) и ядерные клетки (г):

Реакцию взаимодействия с чужеродными телами в организме рыб изучали на лейкоцитах брюшного экссудата, полученных после введения микробных тел (Микряков, Балабанова, 1979). Реакцию иммунокомпетентных клеток (ИМК) в брюшном экссудате на введенный антиген определяли через 2, 5, 10, 15, 30, 60, 120 мин и через 1, 2, 3, 5 сут и более. Иммунокомпетентные клетки рыб классифицировали по В. И. Лукьяненко и Е. И. Свиридову (1967) и по М. П. Покровской с соавт. (1965). Характер взаимодействия ИМК в брюшном экссудате оценивали под световым микроскопом. Учет клеток проводили в 25 полях зрения.

Функциональную разнокачественность лимфоцитов определяли в реакции бласттрансформации. В качестве митогенов использовали конканавалин А (Кон. А) и птичий туберкулин (ППД). Реакцию лимфоцитов на митогены определяли *in vitro* и *in vivo* (Микряков, Степанова, 1981, 1983). Опыты ставили на лимфоцитах мезонефроса и селезенки карпов. Клетки из лимфоидной ткани почек и селезенки извлекали по методике Тессенова (Tessenow, 1979). Митогены использовали в дозах 100 (Кон А) и 500 (ППД) гамм на особь и по 10 и 40 гамм при постановке опытов *in vitro*. Лимфоциты культивировали в комбинированной среде, состоящей из среды 199 (89.6 мл), эмбриональной телячьей сыворотки (10 мл), RPMI 1640 (4.5 мл), 0.2 мл 1 м раствора N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2 этансульфановой кислоты (ГЭПЭС), пенициллина и стрептомицина по 25 тыс. ед. Общее число лимфоцитов, вносимых в опыт, равнялось  $4 \times 10^6$ , а среды — 4 мл. Клетки инкубировали в эксикаторах, содержащих 5%  $\text{CO}_2$  при температуре 22°C. Учет реакции осуществляли через 1, 2, 4, 8 сут. Реакцию лимфоцитов на митогены учитывали под световым микроскопом, согласно методике Н. Л. Самойлиной (1970). В каждом препарате подсчитывали 1000 кл.

Иммуноциты для исследования их ультратонкой структуры выделяли из лимфоидной ткани мезонефроса и селезенки. При исследовании морфофункциональных свойств АГРК выясняли роль ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ) и патогенных микроорганизмов на взаимодействие иммуноцитов с чужеродными телами. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  из среды извлекали путем добавления 1 мм раствора ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль или трилон Б). ЭДТА разводили на

раствора. Содержание АГРК клеток изучали на иммунных и неиммунных карпах, а также у особей, содержащихся при различных температурах (4, 15, 22 и 26°C) и pH воды (Микряков и др., 1984). Концентрацию водородных ионов в опытах регулировали с помощью  $H_2SO_4$  путем автоматического титрования разбавленной серной кислотой с использованием блока автоматического титрования БАТ-15.

### **Изучение антигенразрушающей функции и метаболизма бактериального антигена в организме рыб**

Об антигенразрушающей функции иммунной системы рыб судили по данным анализа бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК), фагоцитарной активности лейкоцитов, по распределению меченых по  $C^{14}$  микробов в тканях и органах и выведению продуктов распада бактерий из организма. Для исследования этих вопросов использовали цитологические, физические, радиоуглеродные (авторадиографические) и биохимические методы.

Бактерицидные свойства сыворотки крови определяли двумя методами: радиоуглеродным и фотонейтронным (Микряков и др., 1976; 1979).

Радиоуглеродный метод основан на том, что для учета степени роста и развития микробов используется физиологический тест — гетеротрофная ассимиляция углекислоты бактериями по В. И. Романенко (1966). Сущность ее заключается в том, что микробы в процессе роста и развития, как это показано В. И. Романенко (1966) с помощью радиоактивного углерода, поглощают углекислоту пропорционально приросту их биомассы. При неблагоприятных условиях развития количество ассимилированной углекислоты микроорганизмами либо снижается, либо прекращается при полном подавлении их жизнедеятельности. Исходя из этого, нами была показана возможность использования гетеротрофной ассимиляции углекислоты бактериями при изучении антимикробных свойств сыворотки крови рыб (Гончаров и др., 1966).

Схема постановки опытов. В стерильные пробирки вносили испытуемую сыворотку, рыбопептонный бульон, стерильный раствор меченой по  $C^{14}$  соды, соответствующий 50—100 тыс. имп/мин и тест-микробы. Пробирки закрывали каучуковыми пробками и инкубировали при комнатной температуре в течение 5—6 ч. После инкуба-

лина и фильтровали через мембранный фильтр № 2. В случае отсутствия необходимых условий для фильтрации пробы после фиксации можно хранить неопределенно долгое время. В целях удаления радиоактивного карбоната фильтры после высушивания обрабатывали вначале 1%-ным раствором соляной кислоты, затем дистиллированной водой по 15 мин. После обработки фильтры вновь высушивали и использовали для измерения радиоактивности бактерий под счетчиком Гейгера. Контролем служили бактерии, выращенные на среде без сыворотки. Количество сыворотки в питательной среде в зависимости от цели опытов может колебаться, начиная от разведения 1:1 и выше.

Характер влияния сыворотки рыб на рост и развитие бактерий устанавливали путем сравнения радиоактивности бактерий в опыте с таковой в контроле и выражали в импульсах в минуту или в процентах. Бактериостатический эффект сыворотки крови, выраженный в процентах, считается более удобной единицей измерения. Это позволяет сравнивать БАСК одной особи или группы с таковой других. БАСК рыб определили по следующей формуле:

$$\text{Бэф} = \frac{P_k - P_o}{P_k} \times 100, \text{ где}$$

Бэф — бактериостатический эффект сыворотки крови,  $P_k$  — радиоактивность бактерий в контроле, имп./мин,  $P_o$  — радиоактивность микробов в опыте, имп./мин, 100 — коэффициент перевода радиоактивности бактерий, %.

Исследование антимикробных свойств сыворотки крови, проведенное разными методами, показало высокую чувствительность разработанного нами способа (табл. 2).

Данный способ позволяет осуществлять сбор материала не только в лабораторных условиях, но и в полевых.

БАСК определяли с помощью фотонейтриметрического метода по схеме, предложенной О. В. Смирновой и Т. А. Кузьминой (1966) для исследования защитных функций гуморального звена иммунной системы теплокровных животных. БАСК устанавливали по характеру изменения оптической плотности среды, содержащей микробы и сыворотку крови. Оптическую плотность измеряли до и после постановки опытов.

Для постановки опытов фотонейтриметрическим методом использовали РПБ, разведенный в 5 раз физиоло-

**Сравнительная характеристика антимикробных свойств сыворотки крови леща, полученная с помощью различных методов**

Номер сыворотки	Методы определения		Номер сыворотки	Методы определения	
	РУ	ФНФ		РУ	ФНФ
1	85	82	11	96	84
2	98	86	12	96	87
3	100	87	13	100	86
4	85	81	14	100	75
5	100	95	15	100	100
6	71	59	16	97	95
7	89	86	17	83	90
8	90	87	18	80	82
9	97	77	19	87	87
10	98	81	20	100	83
			Среднее:	93±2	83±2,1

Примечание. РУ — радиоуглеродный метод, ФНФ — фотонейтронный метод.

бирку после внесения 0.5 мл сыворотки крови добавляли 50 млн. бактериальных тел. Содержимое пробирок тщательно смешивали и определяли их оптическую плотность на ФЭКе при зеленом светофильтре. В контрольную кювету наливали дистиллированную воду. После измерения оптической плотности контрольные и опытные пробирки закрывали пробками и ставили в термостат на 5—6 ч при температуре 26°C.

Для установления величины БАСК первоначально измеряли процент нарастания оптической плотности в опытной пробирке по отношению к контролю по формуле:

$$D_n = \frac{D_o2 - D_o1}{D_k2 - D_k1} \times 100, \text{ где}$$

$D_n$  — оптическая плотность нарастания по ФЭКу,  $D_o1$  — исходная оптическая плотность перед началом опыта,  $D_o2$  — оптическая плотность в конце опыта,  $D_k1$  — исходная оптическая плотность в контроле,  $D_k2$  — оптическая плотность контроля после инкубации микробов, 100 — коэффициент перевода оптической плотности, %. Бактерицидную активность сыворотки крови устанавливали путем вычитания от 100% показателя нарастания оптической плотности.

Кровь для получения сыворотки собирали из хвосто-

ние сыворотки от сгустка крови осуществляли либо после центрифугирования, либо после выдерживания крови в холодильнике через 18—24 ч. Опыты по определению БАСК ставили на 4—5-е сутки от момента взятия крови. Сыворотку крови до постановки опытов хранили в холодильнике в пастеровских или в специально приготовленных для этой цели пробирках.

Фагоцитоз и фагоцитарную активность лейкоцитов изучали *in vivo* и *in vitro* (Гончаров, 1966, 1970). При определении фагоцитарной активности лейкоцитов *in vivo* бактерии первоначально вводили в брюшную полость, а затем через определенные промежутки времени брали пробу полостного экссудата для получения мазка на предметных стеклах. Мазок фиксировали метиловым спиртом и красили азур-эозином по Романовскому. Для определения фагоцитирующей способности лейкоцитов *in vitro* использовали клетки, выделенные из лимфоидной ткани почек карпов. Методику получения лейкоцитов и способ постановки опытов описал Г. Д. Гончаров (1970).

Фагоцитарную активность оценивали по количеству фагоцитирующих и нефагоцитирующих лейкоцитов с завершенным и незавершенным фагоцитозом на 100 или 200 кл. белой крови (в зависимости от обилия выхода лейкоцитов). Завершенный и незавершенный фагоцитоз различали по разрушению бактериальной клетки.

Распределение и разрушение антигена на уровне организма изучали с помощью меченых  $^{14}\text{C}$  *A. punctata*, *Hydrogenomonas facilis*, *Bacterium prodigiosum*. Микроорганизмы метили  $^{14}\text{C}$  на питательной среде, один из компонентов которой содержал радиоактивный углерод. *Hydrogenomonas facilis* выращивали на среде с  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  в атмосфере с газообразным водородом в условиях автотрофного роста по прописи В. И. Романенко и Б. А. Флерова (1969). Другие микроорганизмы выращивали на рыбо-пептонном бульоне с добавлением меченой  $^{14}\text{C}$  глюкозы. Полученные микроорганизмы многократно промывали физиологическим раствором и инактивировали путем нагревания при  $70^\circ\text{C}$  в течение 20 мин, а их радиоактивность определяли под счетчиком Гейгера—Мюллера. Количество вводимых бактерий дозировали, исходя из массы рыбы. Антиген вводили внутривентриально и внутрисердечно с удельной активностью 20—40 тыс. имп./мин, содержащей 150—250 млн. бактериальных кле-

авторадиографии с последующим пересчетом плотности почернения и мокрого сожжения органов по Кругу и Кейсу в модификации Ю. И. Сорокина (1959). При расчетах учитывали коэффициент самопоглощения В-излучения тканями (Лукьяненко, Сорокин, 1965; Гончаров и др., 1966; Трофимова и др., 1973, 1978). Для его определения к приготовленному гомогенату тканей добавляли меченые бактерии с заведомо известной радиоактивностью. Затем 50 мг ткани помещали на бумажный фильтр (10 фильтров для каждой ткани) и определяли его радиоактивность. Отношение исходной активности к полученной есть коэффициент самопоглощения.

В целях установления характера участия  $^{14}\text{C}$ -микробов в обменных и иммунологических процессах мы изучали содержание радиоактивного углерода бактерий в составе белков, липидов, гликогена и антител. Белки из гомогенатов тканей осаждали 10%-ным раствором трихлоруксусной кислоты, осадок промывали смесью спирта с эфиром (3:1) и отделяли центрифугированием (Трофимова, Микряков, 1978; Балабанова, 1979). Радиоактивность определяли в осадке и надосадочной жидкости. Липиды из тканей выделяли по методу Фолча (Folch et al., 1957), а гликоген — по методу Зейфтера с соавт. (Seifter et al., 1950). Антитела из сыворотки крови удаляли реакцией агглютинации, а белковые фракции сыворотки крови разделяли путем электрофореза на агаре или ацетат-целлюлозной пленке. Радиоактивность в агглютинатах и электрофореграммах устанавливали путем прямого счета на счетчике и методом макроавторадиографии (Микряков, Балабанова, 1984). Для получения авторадиографов использовали перфорированную рентгеновскую пленку РФ-3 шириной 35 мм и чувствительностью 1000 обратных рентген (Гончаров и др., 1966). Вначале электрофореграммы или агглютинаты, нанесенные на полоски бумаги, заворачивали вместе с рентгеновской пленкой в черную бумагу и экспонировали от 15 сут до 6 мес., затем проявляли. По плотности почернения пленки оценивали радиоактивность исследуемых образцов.

Метод микроавторадиографии использовали для изучения характера распределения  $^{14}\text{C}$ -бактерий в ИМК рыб (Микряков, Балабанова, 1979). Цитологические препараты для исследования готовили из лейкоцитов брюшного экссудата, из клеток почек (мезонефроса), селезенки и печени через 1, 3, 6, 12, 24 ч, 2, 3, 4 и 5 сут



рующей среды служила фотографическая эмульсия типа «М», производства ГосНИИхимфотопроект. Обработку цитологических препаратов фотоэмульсией, их окрашивание и учет содержания в них радиоактивного углерода осуществляли по общепринятым в цитологии методам, описанным О. И. Елифановой с соавт. (1977).

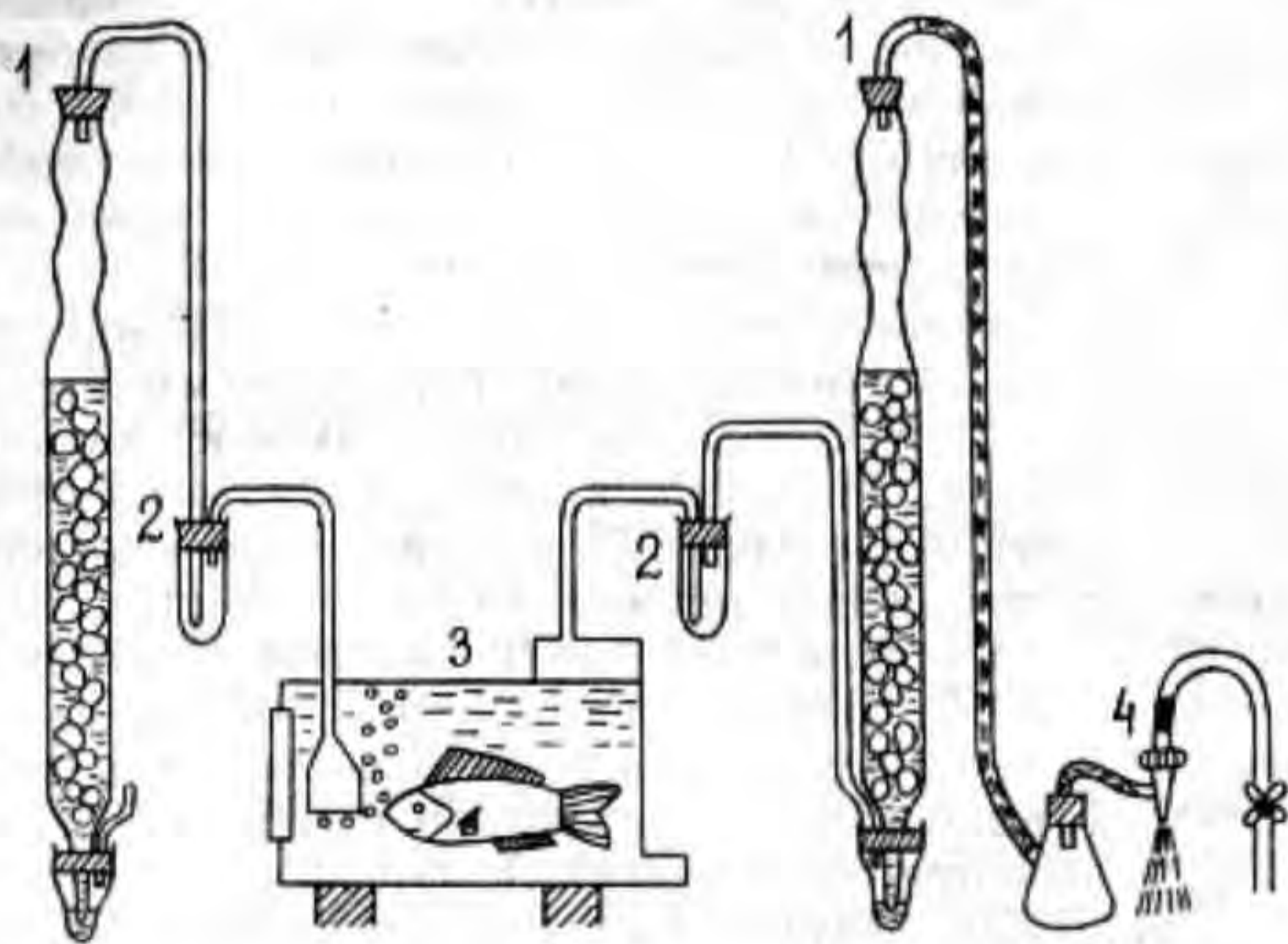


Рис. 2. Схема экспериментальной установки для определения выделения рыбой продуктов распада меченых бактерий.

1 — поглотители углекислоты, 2 — предохраняющие пробирки, 3 — камера для содержания рыбы, 4 — водоустройный насос.

Разрушение микробов на уровне организма изучали по методике В. И. Романенко и Б. А. Флерова (1969). Антигенразрушающую функцию оценивали по данным учета конечных продуктов распада меченых микроорганизмов, выводящихся из организма в виде углекислоты при дыхании и неидентифицированных органических веществ через кожу, кишечный тракт и почки. Опыты ставили в специальных камерах, используемых в физиологии для изучения дыхания рыб (рис. 2). Выделяющуюся при дыхании углекислоту улавливали щелочью в шариковом поглотителе. Через определенное время углекислоту осаждали хлористым барием. По массе образовавшейся соли  $BaCO_3$  определяли интенсивность дыхания рыб, а по радиоактивности ее под счетчиком Гейгера — количе-

углекислоты антигена. Анализы в течение первых 10 сут производили ежедневно в определенные часы, в следующие 12 сут — через 2 сут и более. Опыты по изучению распределения  $^{14}\text{C}$ -бактерий в тканях и выведению продуктов распада из организма ставили на иммунных и неиммунных рыбах, а также на особях, содержащихся при низкой ( $10\text{—}12^\circ\text{C}$ ) и высокой ( $18\text{—}20^\circ\text{C}$ ) температурах и на рыбах с блокированной ретикуло-эндотелиальной системой (РЭС). РЭС рыб «блокировали» путем парентеральной инъекции раствора туши в количестве 0.5 мл, что соответствовало 170 мг туши в сухой массе с содержанием около  $1 \cdot 10^9$  минеральных частичек. При этом все органы с большим содержанием клеток РЭС были черными от скопления туши. Предварительно устанавливали оптимальную дозу туши для данной возрастной группы рыб, так как введение более высоких доз вредно отражается на общем состоянии животных. Через 2 сут после введения туши рыбам вводили внутрибрюшинно меченые бактерии с активностью под торцовым счетчиком Гейгера 470000 имп./мин и биомассой 519 мкг С.

Методы определения антител. Существуют разнообразные способы определения антител. Антителообразовательную функцию иммунизированных бактериями рыб изучали с помощью классической реакции агглютинации по Видалю. Реакцию преципитации и пассивной геммагглютинации использовали при определении антител у особей, подвергнутых иммунизации *O*-антигеном *Aeromonas punctata*. Специфичность антител устанавливали с помощью восходящей хроматографии на бумаге по Кастанеда (метод иммунофиксации антигена антителом на бумаге) или реакцией агглютинации на фильтровальной бумаге (РА-ФБ).

Реакцию агглютинации по Видалю ставили в пробирках длиной 100 мм, диаметром 7—8 мм, по общепринятой схеме, описанной Г. Д. Гончаровым (1973). Антитела изучали в сыворотке крови и в надосадочной жидкости экстрактов тканей и органов рыб (Микряков, 1964а, 1968, 1969а, 1970б; Гончаров, Микряков, 1970; Микряков и др., 1974 и т. д.). Учет реакции осуществляли по 4-балльной системе под агглютиноскопом (Гончаров, 1973).

Надосадочную жидкость для серологического анализа получали из почек, селезенки и печени путем растирания одной части ткани с 9 частями физиологического раство-

течение суток и центрифугирования при 8—10 тыс. об/мин в течение 15 мин.

В целях понимания степени участия ИМК в синтезе антител одновременно изучали реакцию этих клеток на парентеральное введение антигена (Микряков, 1968; 1970б; Микряков, Балабанова, 1979).

Клеточную или плазмацитарную реакцию исследовали под световым микроскопом в мазках-отпечатках почек карпов (Микряков, 1968, 1970а; Микряков, Балабанова, 1979). Карпов иммунизировали двукратно внутривентральными и внутрисердечными инъекциями в дозе 150—250 млн. бактериальных тел с интервалом 5 сут. Материал собирали через 1, 3, 5, 10, 20 и 40 сут после последней инъекции антигена. В каждом препарате подсчитывали до 3 тыс кл.

Реакцию восходящей хроматографии на бумаге по Кастанеда или РА-ФБ ставили по ранее описанной нами методике (Микряков, 1970а). Данный способ был использован для выяснения степени специфичности образующихся антител рыб к микроорганизмам. По принципу взаимодействия антигена с антителом этот способ следует назвать методом иммунофиксации антигена антителом на бумаге.

Сущность методики заключается в том, что при взаимодействии антигена со специфическим антителом образуется комплекс (т. е. происходит иммунофиксация антигена антителом), который при хроматографии в физиологическом растворе остается в точке нанесения. Если же между антигеном и антителом нет специфического взаимодействия, антиген поднимается по бумаге (рис. 3).

В качестве антигена использовали инактивированную нагреванием густую суспензию бактерий в сахарном сиропе, которую предварительно последовательно обрабатывали сульфатом железа (0.5—1%) и водным раствором гематоксилина (1%). Антиген помещали на полоску хроматографической бумаги марки «Быстрая» в виде ряда капель и высушивали. На полученные пятна антигена наносили испытуемую сыворотку. Полоску бумаги до высыхания сыворотки погружали вертикально в физиологический раствор так, чтобы пятна оставались над поверхностью жидкости. Реакцию учитывали через 15—20 мин. Всего использовали 56 сывороток от двукратно иммунизированных карпов и 30 сывороток от неиммунизированных рыб. Анализы проводили в 10-кратной

● +  
1α

● +  
1α

● +  
1α

● +  
1α

● -  
1δ

● -  
1δ

● -  
1δ

● -  
1δ

● -  
2α

● -  
2α

● -  
2α

● -  
2α

● -  
2δ

● -  
2δ

● -  
2δ

● -  
2δ

● -  
3α

● -  
3α

● -  
3α

● -  
3α

● -  
3δ

● -  
3δ

● -  
3δ

● -  
3δ

Рис. 3. Взаимодействие антигенов с сывороткой рыб на бумаге.  
1 — гомологичный антиген, 2, 3 — гетерологичные антигены, а — сыворотка иммунизированных рыб, б — то же неиммунизированных.

(*Aeromonas punctata*, штамм 123) и гетерологичными (*Pseudomonas fluorescens*, штамм 74 и *Escherichia communis*, штамм 960) бактериями. Всего обработано около 2500 хроматограмм. Специфичность антител определяли также в реакции агглютинации по Фишеру путем титрования сывороток в гипертонических растворах поваренной соли и в перекрестных реакциях с гетерологичными бактериями.

дами: пробирочными и капиллярными. О-антиген из исследуемых бактерий *Aeromonas punctata* получали по Буавену (Kabat, Mayer, 1968). Одновременно у рыб, иммунизированных О-антигеном *A. punctata*, антитела выявляли в реакции непрямой гемагглютинации. В качестве носителей антигена использовали ЭБ. Адсорбцию антигена на ЭБ проводили после обработки их 40%-ным раствором формалина и 5%-ным глутаровым альдегидом. Для постановки опытов использовали 2%-ный раствор сенсibilизированных ЭБ. Реакцию ставили луночным методом в плексиглазовых пластинках.

Интенсивность антителогенеза после иммунизации рыб бактериальным антигеном изучали на особях, содержащихся при разных температурах воды (7—12° и 18—20°C), на голодающих и «сытых» и при воздействии на них фенолом в концентрации 10 и 12.5 мг/л (Микряков, 1969; Микряков и др., 1974). Обработку антител цистеином осуществляли по Е. В. Чернохвостовой (1974).

### **Исследование напряженности иммунитета**

Под напряженностью иммунитета понимается степень устойчивости или сопротивляемости рыб к возбудителям инфекционных и инвазионных болезней. Она определяется по разнице степени выживаемости или зараженности рыб паразитами между контрольными и опытными группами животных (рыб). Оценку напряженности иммунитета иммунных к бактериальному антигену рыб осуществляли путем заражения суточной вирулентной культурой *A. punctata*. Рыб заражали внутрибрюшинными инъекциями в дозах, вызывающих 50—100%-ную гибель интактных особей. ЛД<sub>50</sub> или ЛД<sub>100</sub> устанавливали по Риду и Менчу (Гончаров, 1973). Бактерий выращивали либо на РПА, либо на РПБ.

В качестве тест-микробов при определении БАСК, антигенраспознающих функций иммуноцитов, фагоцитарной активности лейкоцитов, синтеза антител, для приготовления вакцин и заражения рыб в основном использовали бактерии *A. punctata* или *A. hydrophila* (Лобунцов, Юхименко, 1981; Рудиков, Грищенко, 1985), выделенных из больных краснухой карпов Курганского рыбхоза Краснодарского края (Микряков, 1964б). Выбор этих микробов для иммунологических исследований обусловлен тем, что они являются наиболее опасными для жизни рыб паразитами, вызывающими массовое заболевание

солончатой водных экосистемах (Scharerclaus, 1979). Они являются возбудителями аэромоноза карпов (Лобунцов, 1974; Афанасьев, 1979) или инфекционной брюшной водянки по Шаперклаусу (Scharerclaus, 1954, 1979), язвенной болезни окуней, чумы сиговых и т. д.

Рыб иммунизировали и заражали суточной культурой микробов, выращенных на РПА или РПБ (Микряков, 1964б, 1969б; Гончаров, 1973).

Статистическую обработку результатов проводили на ЭВМ «Минск-22», применяя методы вариационной статистики.

## **Глава II. РАСПОЗНАВАНИЕ И ВОСПРИЯТИЕ АНТИГЕНА**

Накопленные в современной литературе данные позволяют считать, что все животные способны распознавать и отличать «свое» от «чужого» (Петров, 1976, 1982; Брондз, Рохлин, 1978; Галактионов, 1982, 1983, 1986; Burnet, 1971). Вопросы распознавания «своего» и «чужого» активно разрабатываются на примере теплокровных животных в связи с изучением проблем иммунологической толерантности, возникновением аутоиммунных заболеваний, опухолевых клеток, пересадкой тканей и органов и т. д.

Благодаря успехам неинфекционной иммунологии и молекулярной биологии, достигнутым при разработке генетических основ системы гистосовместимости, показано, что функцию распознавания «своего» и «чужого» в организме высших животных выполняют малые лимфоциты, снабженные антигенраспознающими и антигенсвязывающими иммуноглобулиновыми рецепторами (Брондз, 1977, 1987; Брондз и Рохлин, 1978; Фонталин, Певницкий, 1978; Burnet, 1971; Vitetta, Uhr, 1972; Magchalonis, 1975, 1977; Cooper, 1976).

На вопрос о том, какие клетки иммунной системы рыб являются носителями иммунологической памяти к бактериям и выполняют функцию распознавания, ответа в существующей литературе нет. Можно лишь предположить, что антигенраспознающую функцию у рыб, как и у высших позвоночных животных, осуществляют малые

считать то, что малые лимфоциты у рыб составляют основную массу лейкоцитов (Головина, 1977; 1979; Иванова, 1983; Головина, Тромбицкий, 1989; Ellis, 1977; Fänge, 1977). Согласно данным этих авторов, общее количество лимфоцитов в периферической крови в зависимости от функционального состояния организма (периода годовых циклов рыб, воздействия на них неблагоприятных факторов среды и т. д.) колеблется от 10 до 123 тыс. кл./мл. При анализе лейкоцитарной формулы показано, что на долю лимфоцитов приходится соответственно 45—99% от общего числа лейкоцитов. Содержание лимфоцитов в 1 мл крови у большинства рыб в 5—10 раз больше, чем у теплокровных животных (Алмазов, 1968; Кудрявцев, Кудрявцева, 1974). У рыб, подвергающихся воздействию токсических веществ, количество малых лимфоцитов снижается (Микряков, Флеров, 1971). Они участвуют в инкапсуляции эндопаразитов (Давыдов, 1977, 1981), инфильтрации и отторжении алло- и ксенотрансплантата (Cooper, 1976). Малые лимфоциты рыб, как и высших позвоночных и амебоциты беспозвоночных эволюционно происходят из мезенхимной ткани (Мечников, 1903, 1956; Аничков, 1930; Заварзин, 1945; Хлопин, 1946; Евгеньева, 1976, 1977; Галактионов, 1982, 1983; Burnet, 1971; Cooper, 1976). Лимфоциты рыб снабжены поверхностными иммуноглобулиновыми рецепторами и отвечают реакцией бласттрансформации на митогены и т. д. (Микряков, Степанова, 1981; Chiller et al., 1969; Ellis et al., 1975; Marchalonis, 1977; Etlinger et al., 1976, 1978; Cooper, 1976; Warr et al., 1976, 1979, 1983; Lewis et al., 1979; Clem et al., 1981; Warr, Marchalonis, 1981). Однако как они реагируют и воспринимают «чужое» после парентеральной инъекции бактерий и какие факторы влияют на процессы распознавания чужеродных тел, по данным этих исследований ответить невозможно. Мы изучали состав антиген-распознающих клеток, факторы, влияющие на их функционирование, особенности распределения клеток в организме рыб.

### **Реакция лимфоидных клеток на антиген**

Реакцию клеток изучали в брюшном экссудате карпов и карасей (по 10 экз.) после интраперитонеальной инъекции инактивированных и вирулентных бактерий

риального антигена оценивали по количеству вышедших в брюшную полость лейкоцитов через 2, 5, 10, 15 и 30 мин от момента введения антигена. Лейкоциты из брюшной полости собирали пастеровской пипеткой по 0.1 мл, разбавляли разводящей жидкостью в меланжере (Неменова, 1972) и подсчитывали с помощью камеры Горяева по общепринятой методике. Одновременно из брюшного экссудата готовили мазки для определения лейкоцитов и антигенреагирующих клеток.

Показано, что бактериальный антиген вызывает инфильтрацию лейкоцитов в брюшную полость и их взаимодействие с иммуноцитами. Число лейкоцитов (млн. кл./мл брюшного экссудата), поступающих в брюшную полость иммунных и неиммунных рыб, неодинаково:

Категория рыб	Время взятия пробы, мин				
	2	5	10	15	30
Иммунные	6.6±0.1	7.1±0.3	6.4±0.3	5.8±0.2	5.9±0.1
Интактные	3.3±0.09	4.3±0.1	5.2±0.1	4.9±0.08	5.0±0.2

У иммунных карпов число лейкоцитов, вышедших в брюшную полость в первые 5 мин в 2 раза больше, чем у интактных. Через 10—15 мин различия сглаживаются. Клетки иммунных рыб были более разнообразными, чем интактных (табл. 3).

Таблица 3

Состав клеток брюшной полости карпов после инъекции бактерий *Aeromonas punctata*, %

Время, мин	Лимфоциты	Моноциты	Гранулоциты	Ретикулоциты	Лимфобласты	Плазмобласты	Плазматические клетки
2	66±7.0	3±1.1	0	17.2±2.0	14±1.0	0	0
	92±4.4	8±1.4		0	0		
5	17±0.9	7±0.4	4±0.1	30±2.2	30±1.9	5±0.1	6±0.2
	72±8.1	6±0.5	2±0.1	17±0.8	17±0.8	0	0
10	22±1.4	1±0.01	5±0.2	18±1.7	36±4.1	14±0.9	5±0.1
	58±2.7	3±0.1	2±0.1	32±2.4	3±0.1	0	0

Примечание. Над чертой — клетки иммунных, под чертой — неиммунных рыб.

Если у иммунных рыб через 2 мин после введения бактерий они представлены четырьмя формами, то у интактных — двумя. Через 5 мин число клеточных форм у пред-



Динамика изменения лимфоидно-макрофагальных клеток в брюшной полости карасей, %

Время язв рыб, ч	Число клеток в 25 полях зрения микро- скопа	Малые лимфоциты		Ретикулярные макрофаги	Гранулоциты	Лимфо- и плазмобласты	Плазматиче- ские	Фагоцити- рующие лейкоциты
		активные на стадии трансформации	неактивные на стадии «эпохон»					
0.12	1532 ± 25.0	27.1 ± 1.2	73 ± 5.1	—	—	—	—	27 ± 1.4
	1240 ± 27.0	55.4 ± 4.2	—	36.8 ± 4.4	—	9 ± 1.2	0.5 ± 0.01	—
0.5	890 ± 12.1	80.4 ± 6.3	8 ± 0.7	11 ± 0.8	0.5 ± 0.01	—	—	76 ± 3.3
	931 ± 18.0	61.0 ± 4.7	20 ± 3.7	10.0 ± 0.1	—	6 ± 0.5	4.0 ± 0.4	—
1	612 ± 10.0	61.1 ± 5.2	3.4 ± 0.1	13 ± 1.4	6 ± 1.3	17.1 ± 2.1	—	74 ± 4.5
	760 ± 14.0	86.0 ± 9.4	4 ± 0.2	5.0 ± 0.2	2 ± 0.01	1 ± 0.01	2.0 ± 0.3	—
24	346 ± 9.0	42.4 ± 4.1	1.1 ± 0.1	27 ± 3.2	5 ± 1.2	20.2 ± 3.2	5.2 ± 1.4	48 ± 5.1
	546 ± 10.1	35.0 ± 1.9	16 ± 0.9	39.0 ± 5.8	6 ± 0.8	2 ± 0.01	2.0 ± 0.1	57 ± 8.3
48	381 ± 10.0	14.1 ± 1.9	2.0 ± 0.1	50 ± 6.7	11 ± 2.0	3.4 ± 1.1	20.1 ± 3.2	49 ± 4.2
	311 ± 8.0	20.0 ± 1.8	17 ± 1.6	50.0 ± 6.9	8 ± 0.7	2 ± 0.02	3.0 ± 0.2	25 ± 4.5

Значения в таблице даны в процентах. Над чертой — у неиммунных, под чертой — у иммунизированных рыб.

у неиммунизированных оно равно 5. Плазмобласты и плазматические клетки в брюшном экссудате интактных особей в период наблюдения не выявлены. Сходные результаты получены и на карасях (табл. 4). Различия заключаются в том, что в популяциях лейкоцитов, вышедших в брюшную полость карасей, моноциты не выявлены. Ретикулоциты, гранулоциты, лимфо-, плазмобласты и плазматические клетки (рис. 4) в брюшном экссудате интактных карасей появляются позже, чем у иммунных. Миграция лейкоцитов в брюшную полость у обеих групп рыб, видимо, завершается через 5—10 мин.

По мере выхода лейкоцитов в брюшную полость начинается процесс reagирования клеток с бактериальным антигеном. В распознавании бактериальных тел в основном участвуют одни лимфоциты. Через 2 мин после введения чужеродных тел увеличивается число клеток с прилипшими бактериями. Интенсивность прилипания бактерий к лимфоцитам зависит от адаптированности клеток

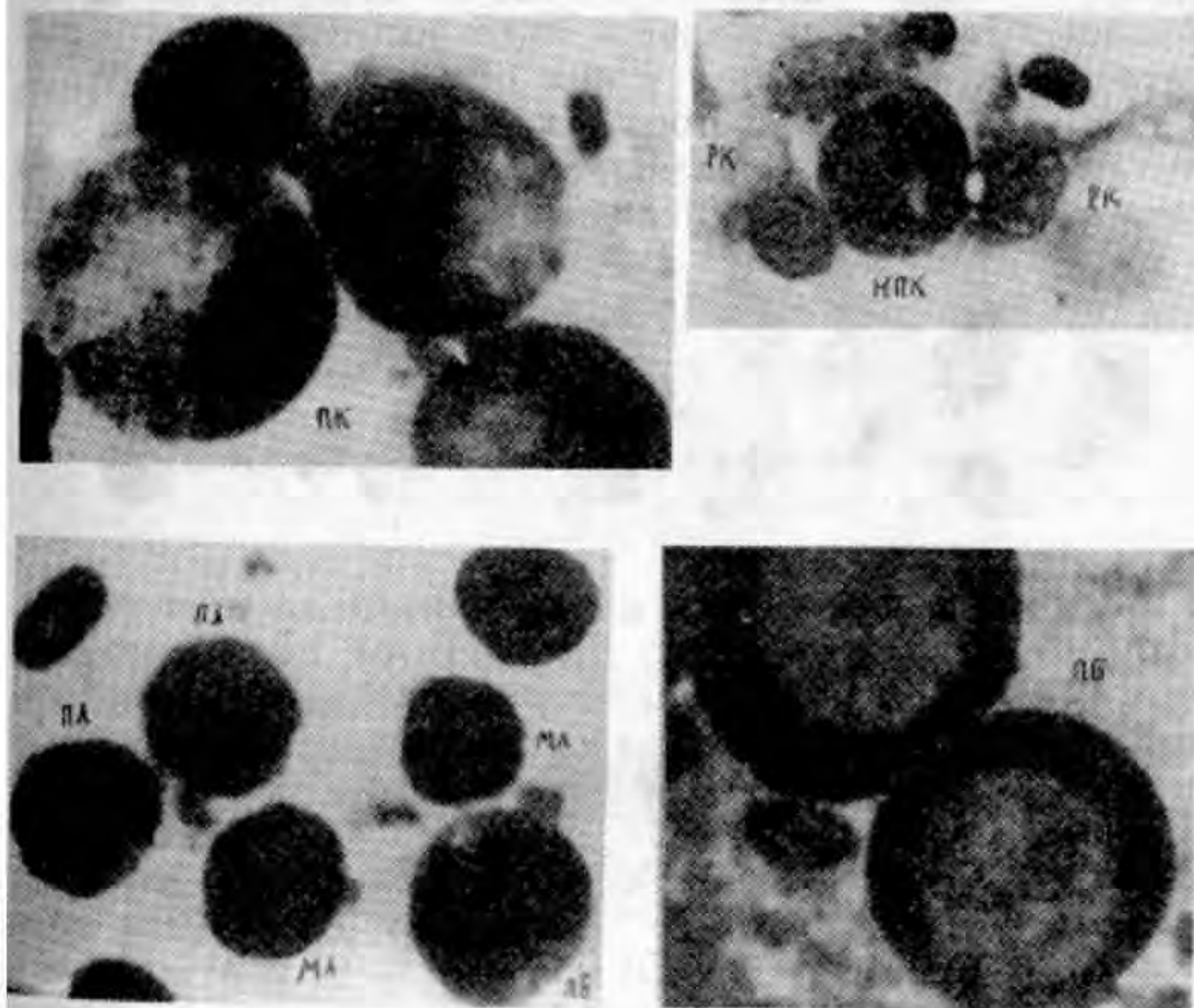


Рис. 4. Иммунокомпетентные клетки.

ЛБ — лимфобласты, МЛ — малые лимфоциты, ПЛ — пролимфоциты, ПБ — плазмобласты, НПК

к данному антигену. Все лимфоциты брюшной полости иммунизированных карасей реагировали с введенным антигеном бактерий, тогда как число лимфоцитов с прилипшими бактериями у интактных особей в среднем равнялось 27—39%. Со временем количество реагирующих лимфоцитов в брюшной полости интактных особей нарастало до 75% (табл. 4). Не менее важным отличительным признаком, обуславливающим различную активность лимфоцитов, следует считать число микробных тел, обнаруженное на их поверхности. В среднем каждый активный лимфоцит у интактных особей имел 5—6 бактериальных тел, а у иммунизированных — 10 и более (рис. 5). Это хорошо видно при исследовании реакции лимфоцитов *in vitro*, выделенных из лимфоидной ткани туловищных почек, селезенки и периферической крови с бактериями *A. punctata*. У иммунных рыб нарастает не только число антигенреагирующих лимфоцитов, но и количество антигенраспознающих рецепторов. Иммунизация, по-видимому, приводит к изменению количества антигенраспознающих рецепторов, что соответственно отражается на функциональной активности малых лимфоцитов. Вполне вероятно, у них повышается число уropодий и филоподий, которые, как указывает Т. П. Евгеньева (1976, 1977), являются одним из основных клеточных образований, выполняющих функцию передвиже-

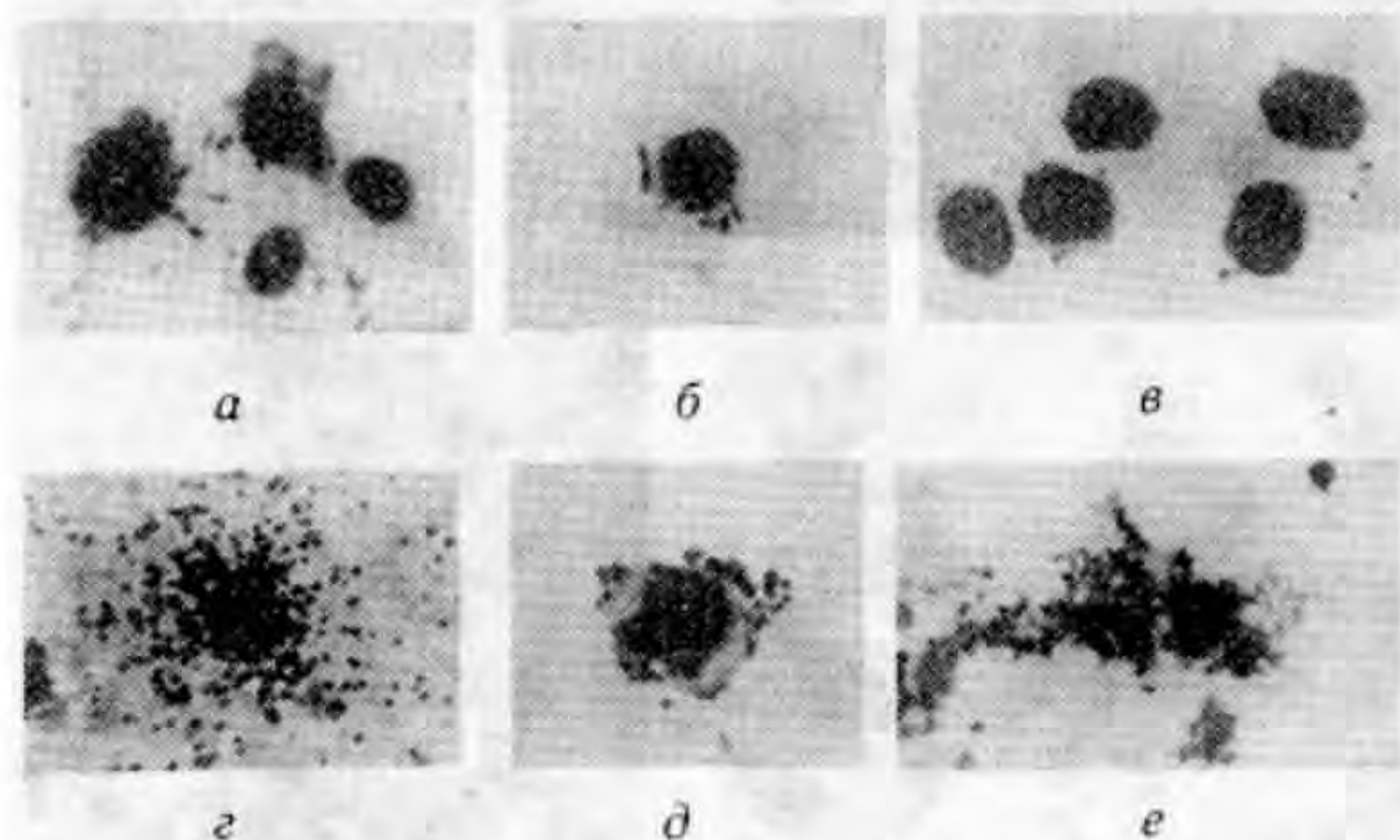


Рис. 5. Взаимодействие бактерий с лимфоцитами в реакции иммуноцитотоксичности с клетками неиммунизированных (а, б, в) и иммунизированных (з, д, е) рыб.

ния, контакта с антигеном и разрушения чужеродных тел. Обнаруженное различие в количестве антигенреагирующих лимфоцитов у иммунных и неиммунных рыб свидетельствуют о том, что иммунизация приводит к модификационной изменчивости функциональной активности антигенраспознающих клеток.

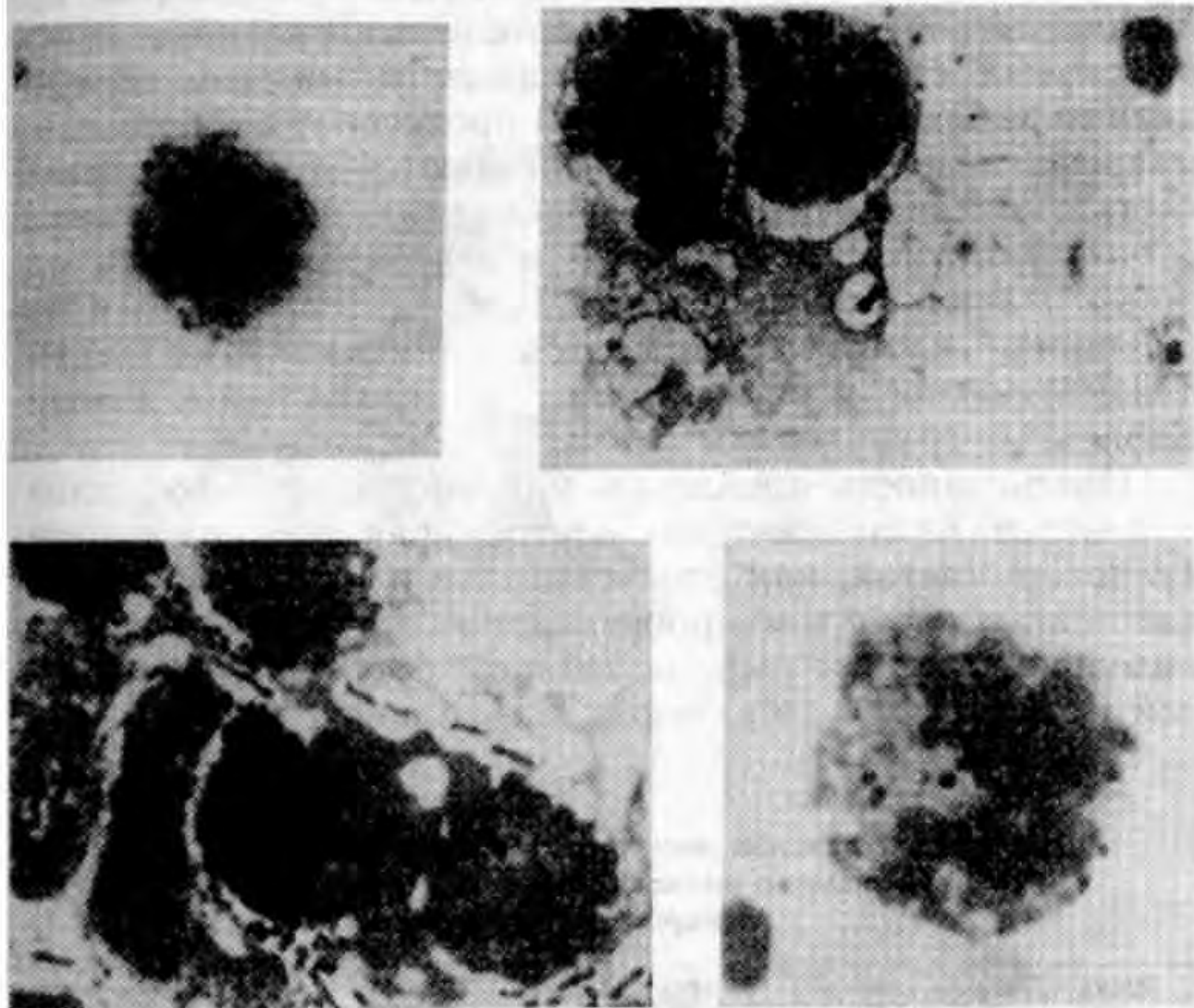


Рис. 6. Индуцированные макрофаги в брюшной полости рыб.  
Окраска по Романовскому-Гимза; ок.  $\times 7$ , об.  $\times 125$ .

По мере включения малых лимфоцитов в реакцию с антигеном, они, по-видимому, в отличие от теплокровных животных, трансформируются в функционально активные макрофаги. Трансформация лимфоцитов в макрофаги происходит тотчас после адгезии бактерий на поверхности малых лимфоцитов и сопровождается поглощением микробных тел и гипертрофией клеточных субстанций. При этом ядерная субстанция лимфоцитов становится рыхлой, некомпактной и с неровными контурами. В процессе взаимодействия клеток с бактериями объем лимфоцитов увеличивается в 40 и более раз (рис. 6). Нарастание

цитоплазмы и ядерной субстанции. Макрофаги отличаются от лимфоцитов и других форм лейкоцитов обильной сетчатой цитоплазмой с вакуолями, содержащими большее число разрушенных бактерий. Ядерная субстанция у большинства макрофагов имеет разнообразную форму, хроматин располагается либо в центре, либо эксцентрично в виде отдельных глыбок, лопастей и т. д. (рис. 6). Между мононуклеарными макрофагами, находящимися на разных стадиях трансформации, и малыми лимфоцитами наблюдается сходство. В процессе трансформации макрофаги, по-видимому, превращаются в ретикулярные клетки, отличающиеся от переходных форм огромной сетчатой цитоплазмой (рис. 6) и лептохроматиновым ядром с нежной ядерной субстанцией. Одновременно в популяциях клеток появляются лимфо-плазмобласты, плазматические и ретикулярные, нейтрофильные и эозинофильные гранулоциты.

Интенсивность появления макрофагов, лимфо-, плазмобластов, плазматических клеток, гранулоцитов и ретикулярных клеток, как это установлено нами, зависит от патогенных свойств микроорганизмов и адаптированности иммунной системы рыб, вызванной путем предварительной иммунизации (Микряков, Балабанова, 1979).

Таблица 5

**Динамика изменения лимфоидно-макрофагальных клеток в брюшной полости карасей после введения вирулентных микроорганизмов**

Время взятия пробы, ч	Число клеток в 25 полях зрения микро- скопа	Лимфоциты, %		Гранулоциты, %		Фагоцити- рующие лейкоциты, %
		на стадии дегенера- ции	неактивные на стадии «покоя»	нейтрофилы	эозинофилы	
0.12	1690±30.1	—	100	—	—	20±2.4
	1710±31	—	100	—	—	—
0.5	1513±20.0	10.2±0.9	84±9.7	2±20.4	4±1.3	29±2.7
	1250±16	10.0±1.0	88±10.1	1±0.01	1±0.01	6±1.4
1	1440±18.0	26.0±2.4	47±6.1	13±1.9	14±2.2	6.1±1.8
	775±13	9.9±1.1	87±8.3	1±0.01	2±0.1	5±1.6
24	731±15.0	30.0±2.7	20±1.7	15±2.3	35±5.1	—
	300±10	21.0±1.7	59±7.2	12±1.4	8±0.9	—
48	все рыбы погибли от сепсиса					
	210±8	82.0±7.4	8±1.6	5±0.7	5±1.0	—

Примечание. Над чертой — после инъекции вирулентных бактерий *Aeromonas punctata*, под чертой — после инъекции грибов *Candida*

После введения вирулентных микроорганизмов *A. punctata* и *Candida albicans* в популяциях лейкоцитов брюшного экссудата ретикулярные макрофаги и лимфо-плазмобласты не появляются (табл. 5). Это, вероятно, обусловлено разрушением АГРК, трансформирующихся в макрофаги. Из-за усиленного размножения *Aegomonas punctata* АГРК полностью разрушаются (рис. 7), а под воздействием *Candida albicans* клетки уменьшаются в размере и лизируются (рис. 8).

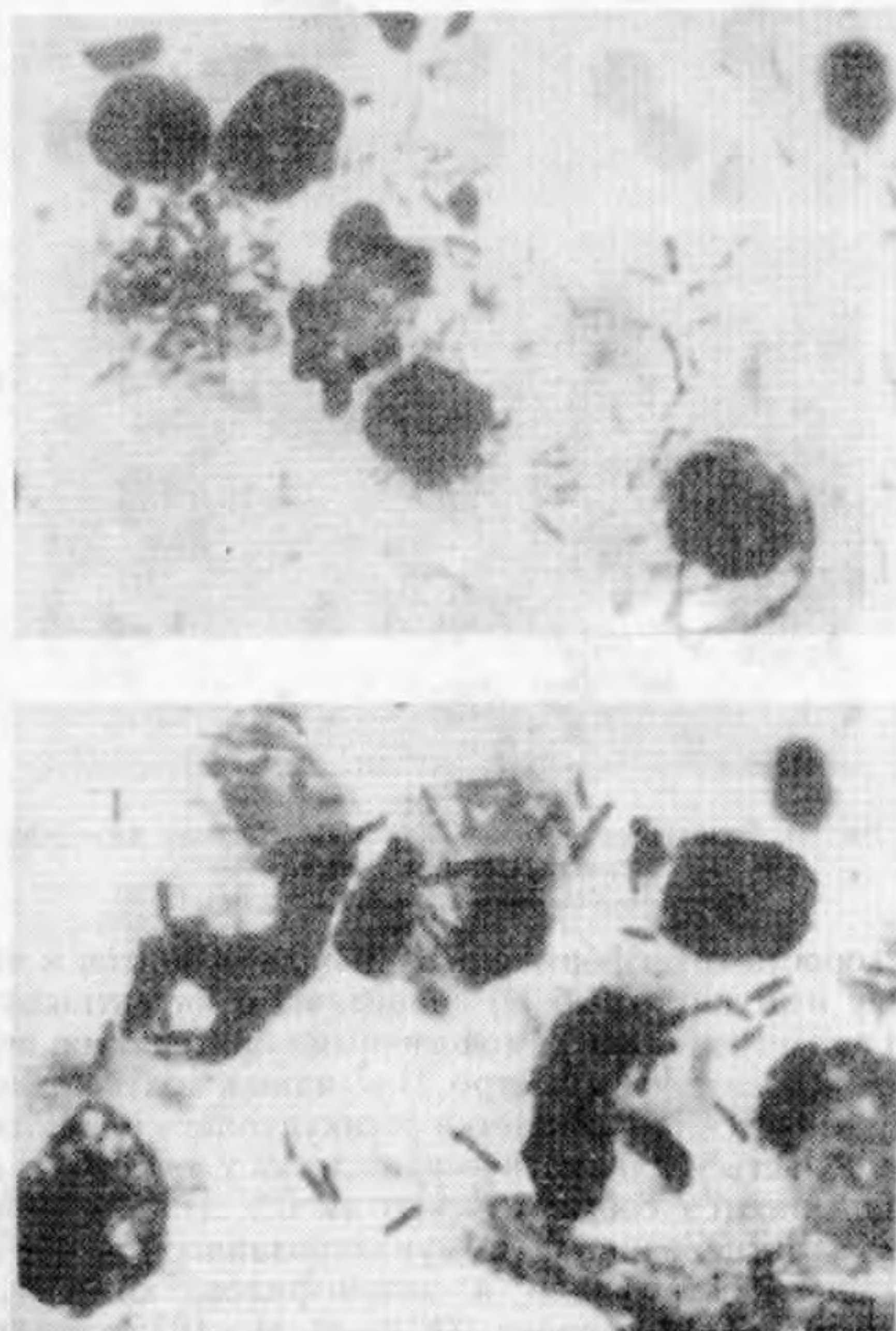


Рис. 7. Разрушение лейкоцитов под действием размножающихся бактерий.

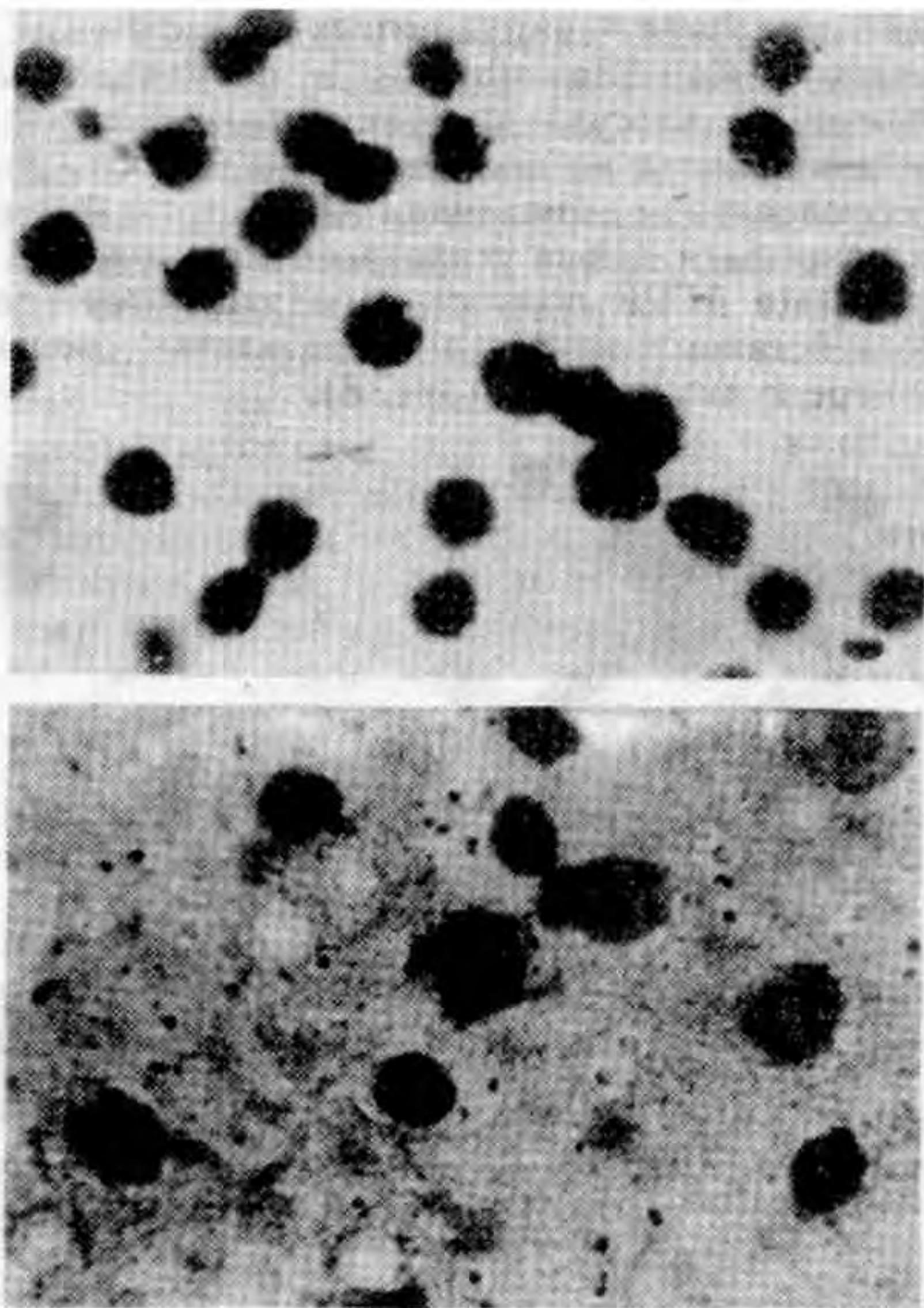


Рис. 8. Разрушение (лизис) лимфоцитов после инъекции грибов *Candida albicans*.

Окраска по Романовскому-Гимза; ок.  $\times 7$ , об.  $\times 125$ .

Скорость трансформации малых лимфоцитов в макрофаги у иммунных рыб по сравнению с интактными особями при воздействии гомологичными бактериями, вероятно, происходит очень быстро. Наглядным подтверждением этому является то, что клетки ретикулярного ряда, лимфоплазмобласты и плазматические клетки у интактных карасей появляются соответственно на 0,5, 1 и 24 ч позже, чем у адаптированных (иммунизированных) особей. Содержание нейтрофилов и эозинофилов, которые, как указывает Еллис с соавт. (Ellis et al., 1975), являются показателем интенсивности воспалительного процесса, у иммунных и интактных особей после введения интактных

после инъекции возбудителей аэромоноза, эти клетки через сутки составляют 50% всех лейкоцитов, вышедших в брюшную полость (табл. 5). Наличие большого количества эозинофилов и нейтрофилов в брюшной полости карасей, зараженных вирулентной культурой микробов *Aeromonas punctata*, свидетельствует об интенсификации воспалительного процесса.

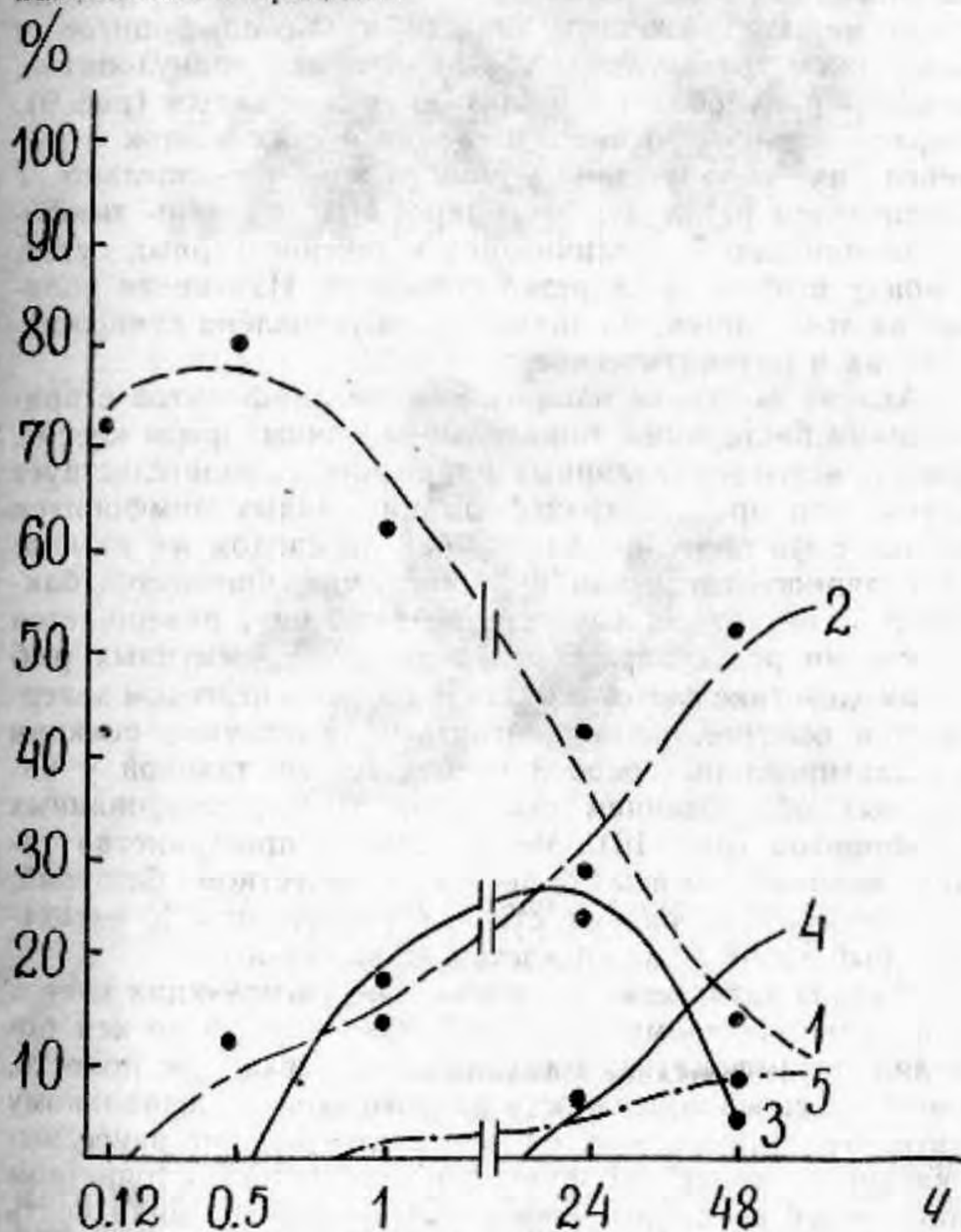


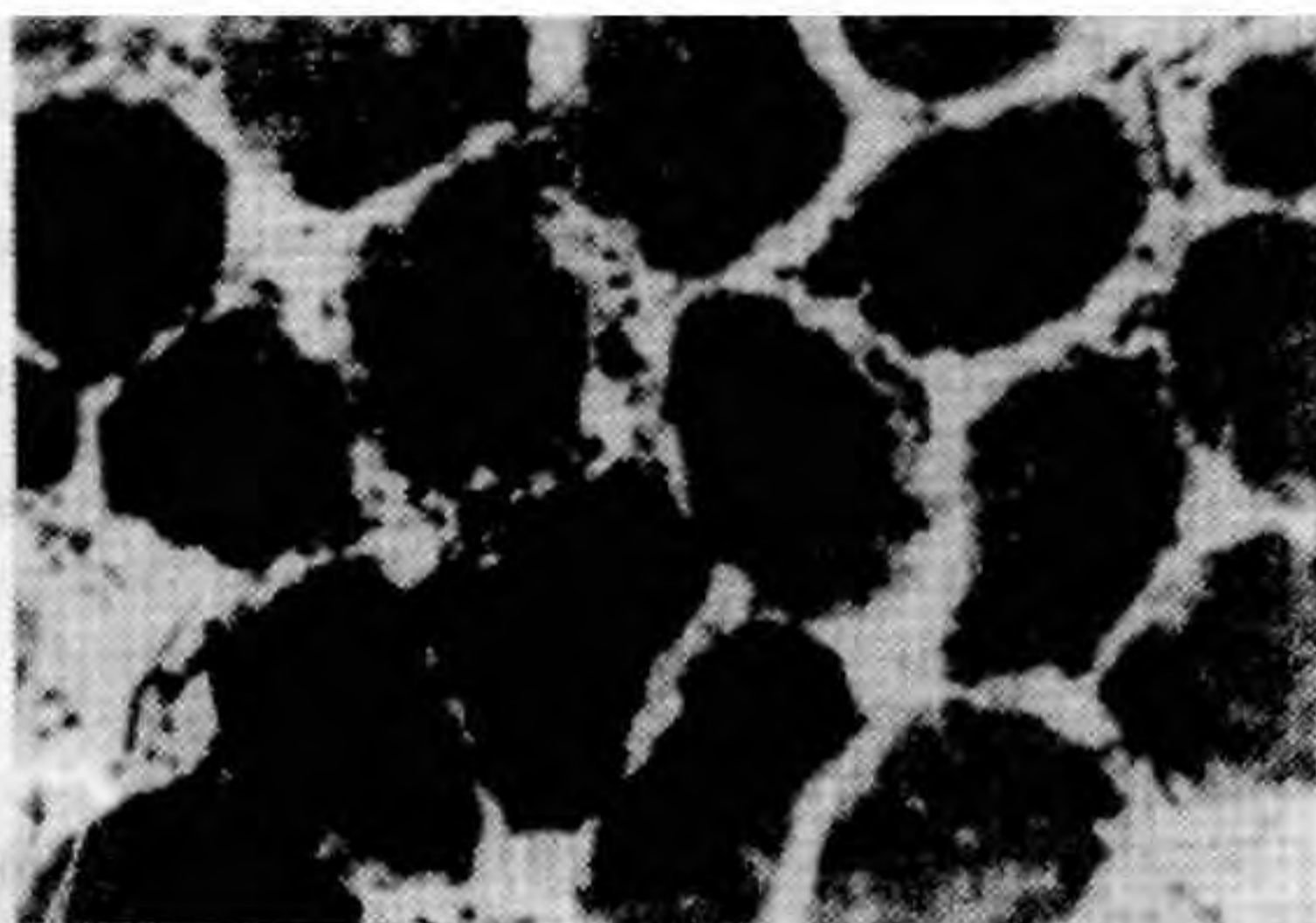
Рис. 9. Динамика трансформированных антигенреагирующих лимфоцитов (1), ретикулоцитов (2), лимфо- и плазмобластов (3), плазматических клеток (4) и гранулоцитов (5) в брюшной полости карасей после введения инактивированных *Aeromonas punctata*.



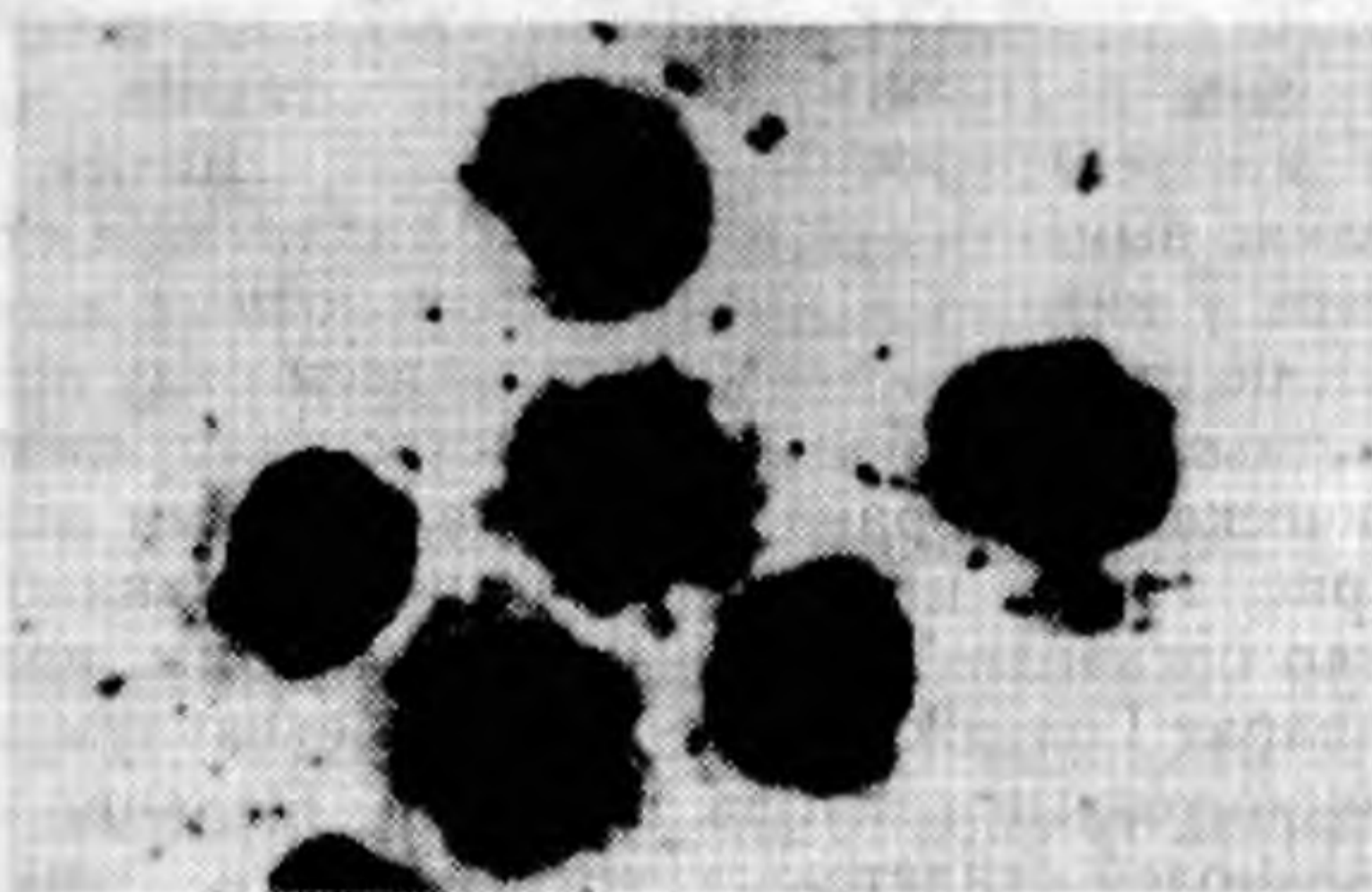
В целях выявления возможной связи между трансформацией лимфоцитов и появлением функционально активных макрофагальных клеток нами проведен анализ хода изменения доли различных типов клеток через разные промежутки времени после инъекции бактериального антигена. При сопоставлении показателей клеточных форм, рассчитанных в 25 полях зрения, установлена обратная связь между снижением общего числа лимфоцитов и появлением ретикулярных макрофагов, гранулоцитов, лимфо- и плазмобластов и плазматических клеток (рис. 9). Нарастание общего числа плазматических клеток с момента их обнаружения происходило параллельно с увеличением ретикулярных макрофагов. Уровень лимфо- и плазмобластов, увеличиваясь в течение первых суток, к концу вторых суток резко снижался. Изменение количества этих клеток, по-видимому, обусловлено превращением их в плазматические.

Анализ динамики изменения доли лимфоцитов с прилипшими бактериями, появление различных форм клеток, прежде всего ретикулярных макрофагов, свидетельствует о том, что процесс трансформации малых лимфоцитов связан с фагоцитозом бактерий и переводом их из корпускулярного состояния в растворимое. Фагоцитоз бактерий у интактных карасей, по-видимому, завершается на стадии ретикулярных макрофагов. У иммунных рыб взаимодействие клеток с бактериальным антигеном завершается быстрее, чем у интактных. Клеточная реакция у адаптированных особей отличается от таковой у интактных образованием скоплений трансформированных лимфоцитов (рис. 10). Межклеточные пространства таких колоний богаты большим количеством бактерий, находящихся на разных стадиях разрушения. У интактных рыб такие колонии клеток не выявлены.

Анализ антигенреагирующих и нереагирующих клеток в популяциях неиммунных рыб показал, что не вся популяция лимфоцитов, поступающая в брюшную полость, имеет на своей поверхности рецепторы к бактериальному антигену. Данные этих опытов подтверждают ранее высказанное мнение, что функцию надзора за постоянством внутренней среды выполняет только определенная часть малых лимфоцитов. Наличие этих клеток в популяциях лимфоцитов, по-видимому, является необходимым условием для индукции иммунологической перестройки организма.



а



б

Рис. 10. Реакция лимфоцитов в брюшной полости иммунных (а) и неиммунных (б) рыб после введения бактериального антигена.

Окраска по Романовскому-Гимза; а — ок.  $\times 10$ , об.  $\times 125$ ,  
б — ок.  $\times 7$ , об.  $\times 125$ .

### Морфо-функциональная характеристика антигенраспознающих структур клеток

Под антигенраспознающими клетками следует понимать эффекторные клетки иммунной системы, снабженные иммуноглобулиновыми рецепторами и участвующие в распознавании «чужого» или генетически чужеродных тел (Брондз, Рохлин, 1979; Лозовой, Шергин, 1981).

Анализ клеточной реакции после введения бактери-

что функцию распознавания «чужого» в основном осуществляют малые лимфоциты (Микряков, Балабанова, 1979).

Малые лимфоциты — наиболее мелкие клетки, округлой формы, размер которых колеблется в пределах 4.5—7 мк. Цитоплазма, как правило, слабо выявляется и снабжена псевдоподиями, а по Романовскому—Гимза окрашивается в голубой цвет. Около 80% объема клетки лимфоцита приходится на долю ядра. Ядерно-цитоплазменное отношение по сравнению с другими типами клеток высокое — 2.5:1. (Микряков, Балабанова, 1979). Ядро темно-фиолетового цвета, хроматин располагается в виде плотных глыбок (рис. 4). У части лимфоцитов в центре ядра обнаруживается ядрышко. Сравнение электронно-микроскопической структуры малых лимфоцитов миксин (Mattisson, Fänge, 1977), камбалы (Ferguson, 1976), угрей (Kreutzmann, 1977), карасей и карпов (Хамидов и Нишамбаев, 1975) с таковыми, полученными на теплокровных животных (Bugnet, 1971), не позволило выявить существенных различий в строении этих клеток у низших и высших позвоночных животных. Наоборот, по строению эти клетки во всем ряду позвоночных животных имеют большое сходство. Наружная цитоплазматическая мембрана снабжена мелкими псевдоподиями (рис. 11). В цитоплазме встречается наибольшее количество органелл: митохондрии, рибосомы, полирибосомы, аппарат Гольджи, гранулярный ретикулум, лизосомы и пиноцитозные вакуоли (рис. 11). Наличие пиноцитозных вакуолей свидетельствует об участии этих клеток в эндоцитозе. Гистохимические исследования лимфоцитов позволили установить наличие в них неспецифических эстераз, кислой и щелочной фосфатазы, азурофильных гранул (только у некоторой части лимфоцитов), полисахаридов, РНК и ДНК. Функция распознавания генетически чужеродных тел и передвижения лимфоцитов, судя по данным Т. П. Евгеньевой (1976, 1977), осуществляется уropодиями и филоподиями (или псевдоподиями), которыми эти клетки богаты. Уropодии и филоподии, по-видимому, являются морфологической основой антигенраспознающих и антигенвоспринимающих рецепторов. Это подтверждается как гистохимическими, так и иммунологическими исследованиями. Цитохимическими реакциями на поверхности лимфоцитов выявлены гликопротеиды, полисахариды, L-фукоза, N-ацетил-d-глюкоза-

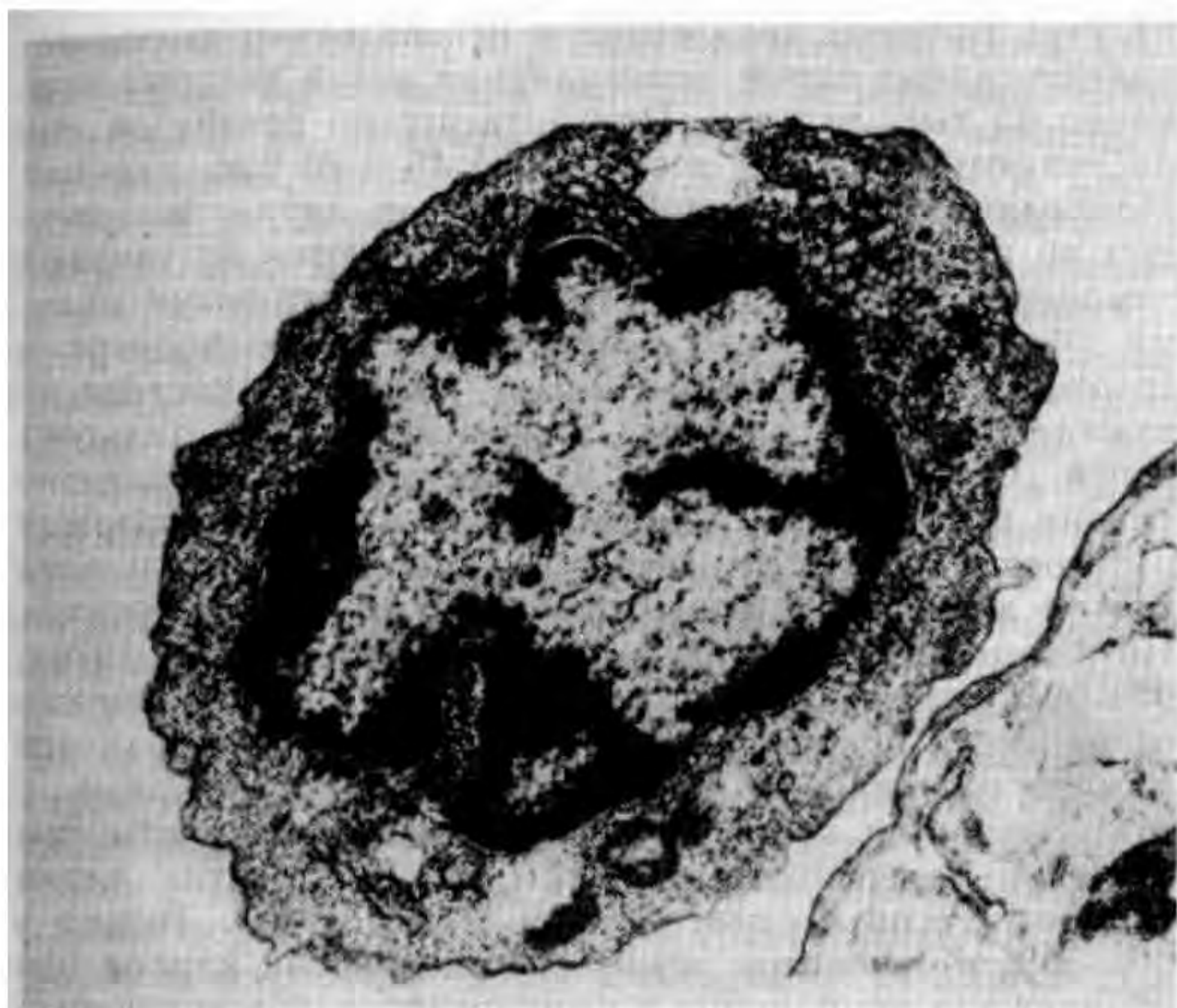


Рис. 11. Ультраструктура малого лимфоцита карпа,  $\times 10000$ .

ее производные, сиаловая кислота (Евгеньева, 1976, 1977; Fiebig et al., 1979, 1980), которые являются составной частью мембранных рецепторов (Fiebig et al., 1979, 1980; Litman et al., 1976; Warr et al., 1976; Marchalonis, 1977; Warr, Marchalonis, 1981). Используя антиминоглобулиновую сыворотку к нормальным иммуноглобулинам рыб IgM и метод розеткообразования к эритроцитам барана, сначала Чиллер с соавт. (Chiller et al., 1969a), а затем Эллис и Паркхауз (Ellis, Parkhause, 1975) и Эммрих с соавт. (Emmrich et al., 1975) на скате, форели и карпе показали присутствие на лимфоцитах поверхностных иммуноглобулинов. Детальное исследование иммуноглобулиновых рецепторов (Marchalonis, 1975, 1977; Etlinger et al., 1976; Cuchens et al., 1977; Fiebig et al., 1979, 1980; Warr et al., 1980, 1983; Ambrosius et al., 1982) позволило идентифицировать и определить их структуру. Клеточные рецепторы лимфоцитов относятся к классу с молекулярной массой около 110—130 тыс. дальтон (Ambrosius et al., 1982). Поверхностные имму-

из двух тяжелых ковалентно и нековалентно связанных полипептидных цепей, молекулярная масса которых примерно 65 тыс. дальтон. При воздействии протеазой они распадаются на  $\alpha$  и  $\gamma$  цепи массой 45 и 20 тыс. дальтон. Мембранные рецепторы В-лимфоцитов карпа, выделенных из пронефроса и селезенки, отличаются от таковых тимоцитов молекулярной массой, полипептидными цепями. Молекулярная масса мембранных В-лимфоцитов в среднем равняется 100—110 тыс. дальтон и состоит из тяжелой (75 тыс. дальтон) и легкой (25 тыс. дальтон) цепей. Связь между ними осуществляется ковалентно (Fiebig et al., 1979). Лимфоциты обоих типов содержат перекрестно-реагирующие детерминанты с гуморальными IgM и клеточными рецепторами Т- или В-лимфоцитов. По данным Этлинджера с соавт. (Etlinger et al., 1976), 90—99% лимфоцитов у радужной форели, независимо от их места концентрации имеют на своей поверхности иммуноглобулиновые рецепторы (ИМГР), сходные с IgM сыворотки крови. Несколько иные результаты при изучении поверхностных ИМГР на лимфоцитах карпа получил Каспи с соавт. (Caspí et al., 1980). Только у 20—30% лимфоцитов периферической крови карпов они обнаружили мембранные и иммуноглобулиновые рецепторы. Лимфоциты рыб, по-видимому, отличаются не только по наличию поверхностных ИМГР и IgM сыворотки крови, но и по наличию антигенсвязывающих рецепторов к чужеродным телам. Например, по данным Льюис с соавт. (Lewis et al., 1979), число розеткообразующих с эритроцитами барана лимфоцитов в периферической крови у канального сомика (*Ictalurus punctatus*) было меньше (4.5%), чем таковых, вступающих в реакцию взаимодействия с бактериями *Aeromonas hydrophila* (8—12% из расчета на 1 млн кл.). Это свидетельствует о том, что лимфоциты рыб в функциональном отношении и по наличию антигенраспознающих рецепторов гетерогенны, что подтверждается данными исследования реакции лимфоцитов рыб на Т- и В-специфические митогены теплокровных животных (Микряков, Степанова, 1981, 1983; Lopez et al., 1974; Cooper 1976; Etlinger et al., 1976, 1978; Cuchens, Clem, 1977; Wratwel, Parish, 1980; Clem et al., 1981).

**Влияние митогенов на лимфоциты карпа.** Большинство работ по изучению действия митогенов выполнено на лимфоцитах периферической крови круглоротых и рыб

Clem, 1977; Clem et al., 1981). Немногочисленны сравнительные исследования влияния Т- и В-специфических митогенов на иммунокомпонентные клетки важнейших лимфоидных органов: тимуса, селезенки, почек. Слабо изучена реакция лимфоцитов карповых на митогены. Между тем, знание этого вопроса имеет определенное значение при выяснении путей становления и эволюции Т- и В-клеточных систем иммунитета в филогенезе позвоночных животных, а также при разработке критериев оценки иммунологического состояния организма рыб.

Функциональную неоднородность лимфоцитов карпа мы исследовали по данным анализа реакции бласттрансформации на митогены, специфичные для Т- и В-клеток теплокровных животных. Опыты ставили на лимфоцитах селезенки и почек 2-леток карпа.

Установлено, что первоначально реакция лимфоцитов на митогены проявлялась в морфологических изменениях структуры ядра. У большинства лимфоцитов они становились рыхлыми и некомпактными. Ядерная мембрана имела неровные контуры. Вероятно, эти изменения, выявленные через 24 ч, обусловлены трансформацией лимфоцитов в макрофаги, либо переходом их в клетки типа бластов.

В результате действия препаратов в почках карпа увеличивалась доля пролимфоцитов, лимфо- и плазмобластов, что свидетельствует об усилении процесса трансформации лимфоцитов (рис. 12).

Кон А, в отличие от ППД, интенсивнее влиял на трансформацию лимфоцитов почек в начале опыта. Через 24 ч после введения Кон А доля трансформированных форм иммуноцитов была выше, чем в опытах с ППД. Однако стимулирующий эффект Кон А быстро снижался и на 8-е сут относительное количество этих клеток почти не отличалось от контроля. Более сильную и продолжительную ответную реакцию иммуноцитов почек вызывал ППД. Доля трансформированных лимфоцитов значительно превысила контроль через 2 сут после введения ППД, а через 4 сут была в 4 раза выше контрольного уровня (рис. 12).

Реакция иммуноцитов селезенки зависела от вида препарата. Количество трансформированных форм лимфоцитов в селезенке контрольных рыб в среднем колебалось в пределах 3%, тогда как ППД приводил к увеличению числа этих клеток в 3 раза (рис. 12). В опыте с Кон А

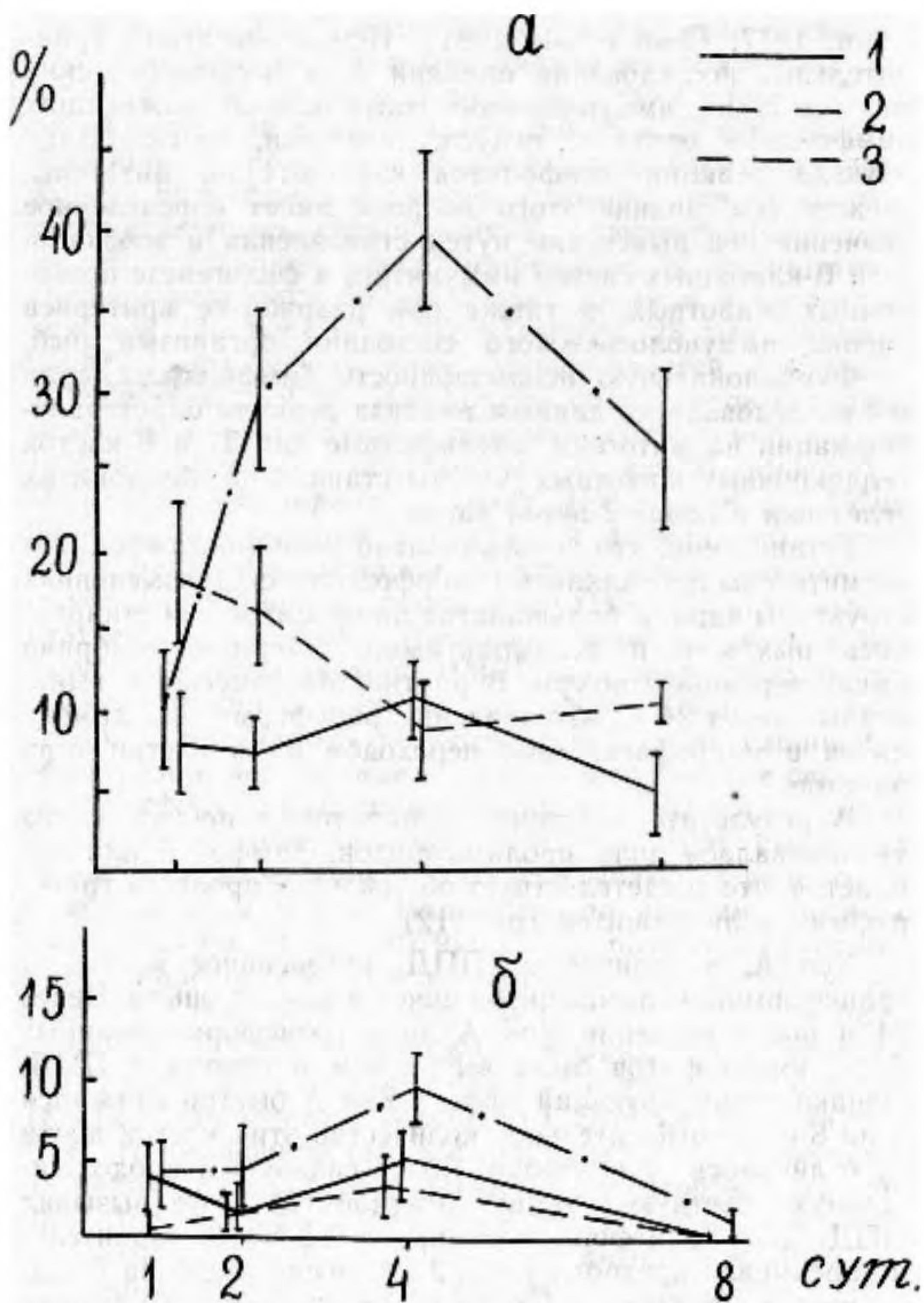


Рис. 12. Изменение относительного количества трансформированных клеток в организме карпа после парентерального введения митогенов (доза 100 мкг/рыбу).

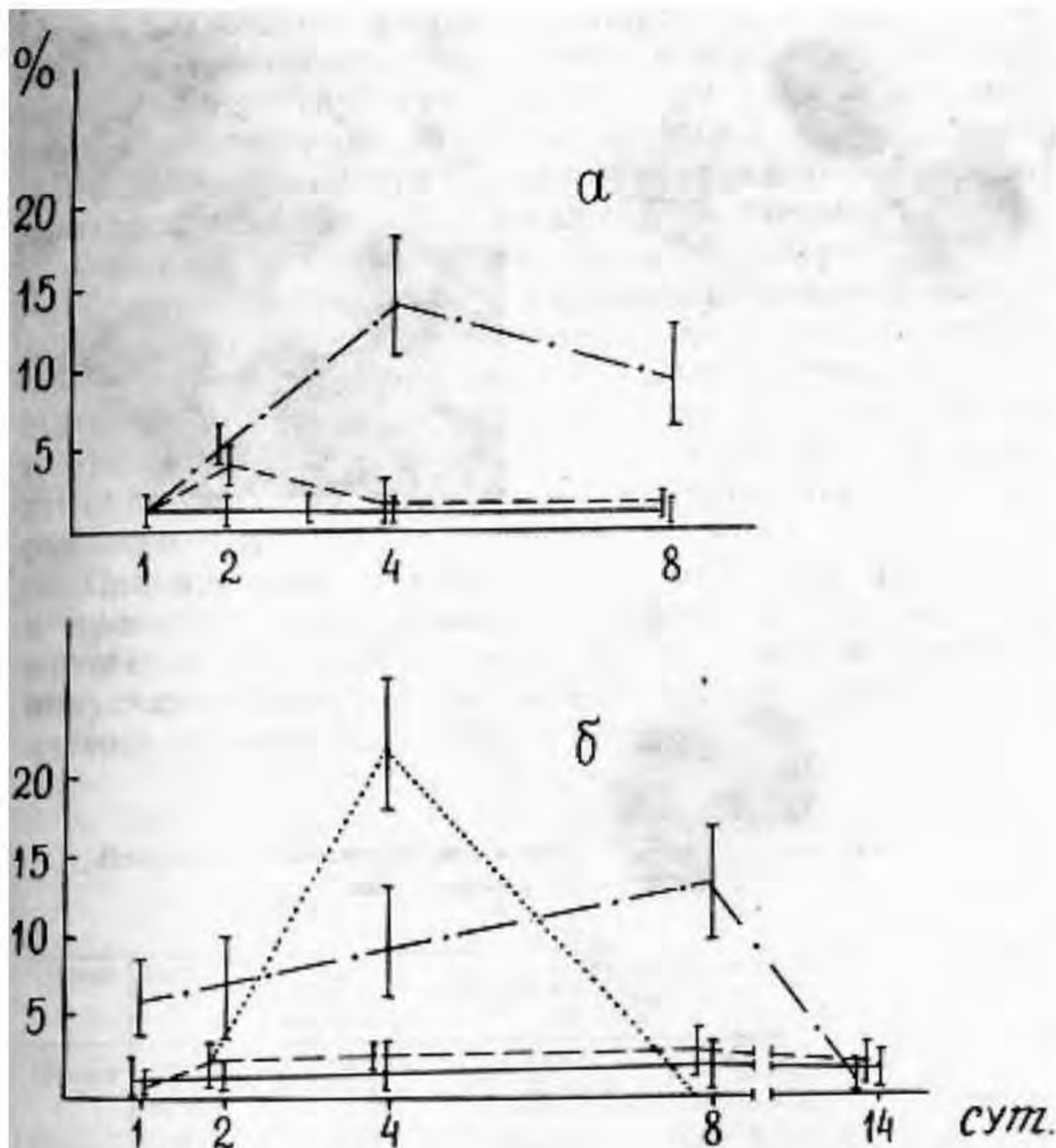


Рис. 13. Изменение митотической активности лимфоцитов карпа после парентерального введения митогенов (доза 100 мкг/рыбу).  
 ▲ — изменение относительного числа клеток антитипичной формы после воздействия Кон А.  
 Остальные обозначения те же, что и на рис. 12.

достоверного изменения доли трансформированных лимфоцитов не обнаружено.

Митогены в организме не только стимулировали процессы трансформации, но и вызывали усиление митотической активности лимфоцитов (рис. 13). У рыб, подвергнутых воздействию ППД, максимум митотической активности лимфоцитов почек и селезенки наблюдали на 4—8-е сут. Доля митотически активных лимфоцитов в почках в этот период повышалась более чем в 13 раз по сравнению с контролем, а в селезенке — почти в 7 раз



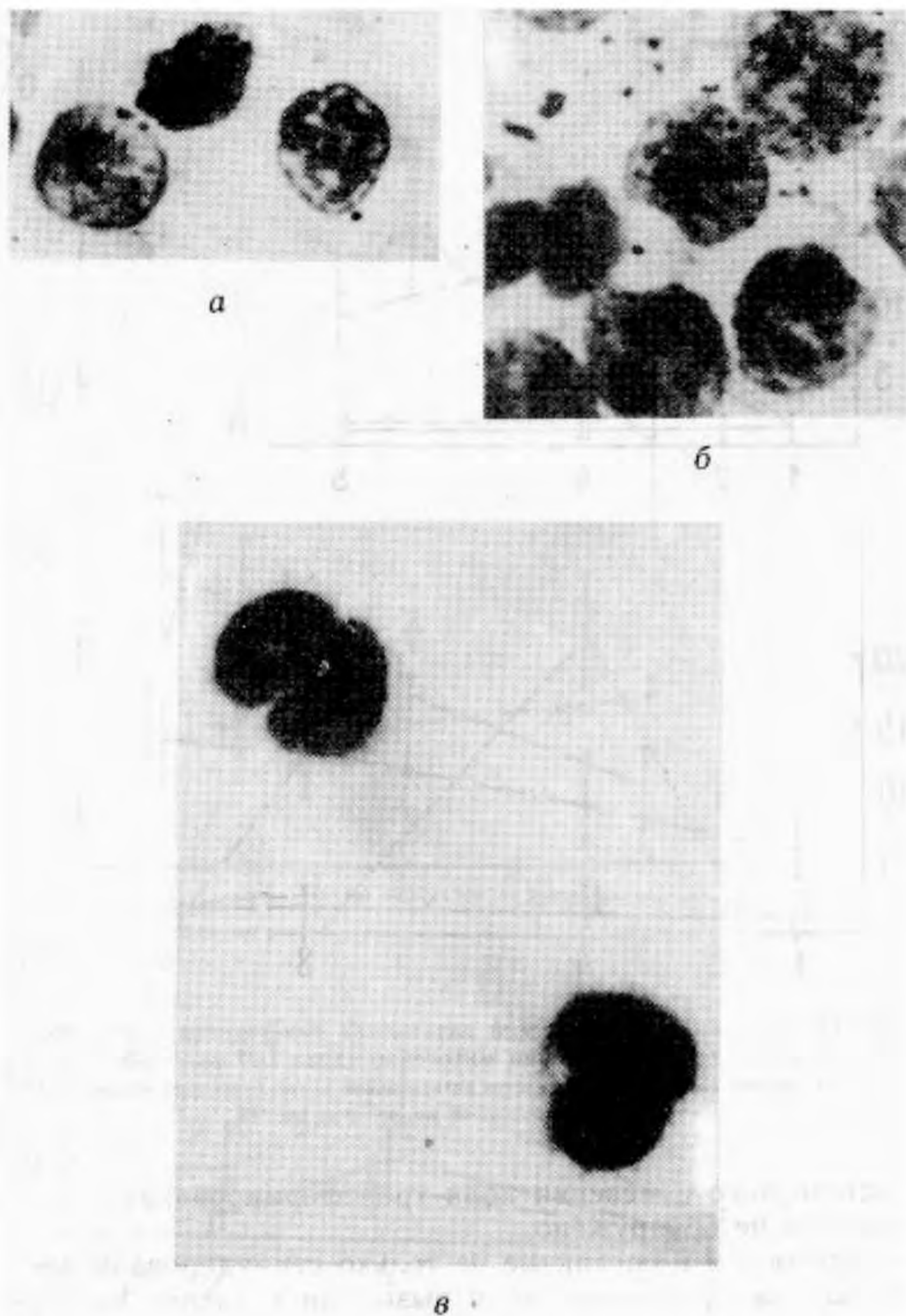


Рис. 14. Делящиеся (а, б) и двухядерные (в) клетки.  
 Окраска по Романовскому-Гимза; а — ок.  $\times 7$ , об.  $\times 90$ , б, в — ок.  $\times 10$ , об.  $\times 125$ .

МИТОТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПОЧЕК В ТЕЧЕНИЕ

После воздействия Кон А на лимфоциты селезенки отмечено появление 2-ядерных лимфоцитов и клеток, ядро которых имело глубокую вырезку (рис. 14). (Эти клетки внешне напоминали парамизлобласты и формы Ридера млекопитающих, встречающиеся при различных патологических состояниях. Максимальное количество таких клеток обнаружено на 4-е сутки (рис. 13). Вероятно, такие клетки появляются из-за нарушения процесса цитокинеза. Снижение их доли к концу опыта свидетельствует о том, что они относятся к коротко живущим видам клеток. Не исключено, что уменьшение доли 2-ядерных клеток к концу опыта связано либо с завершением процесса цитокинеза, либо элиминацией их путем быстрого разрушения.

Одновременно с усилением митотической активности и процессов трансформации лимфоцитов под влиянием митогенов повышается доля плазматических клеток в популяциях иммунокомпетентных клеток (ИМК) исследуемых органов (табл. 6).

Таблица 6

Изменение относительного количества плазматических клеток под влиянием митогенов, %

Орган	Препарат	Контроль до введения митогенов	Время взятия пробы, сут.			
			1	2	4	8
Почки	ППД	1.66 ± 0.74	3.97 ± 1.13*	2.21 ± 0.85*	3.92 ± 1.10*	4.53 ± 1.20*
	Кон А	1.66 ± 0.74	4.30 ± 1.70*	6.30 ± 1.80*	3.97 ± 1.13*	0.66 ± 0.47*
Селезенка	ППД	0.30 ± 0.30	0.43 ± 0.30	1.15 ± 0.60	0.99 ± 0.57	0.30 ± 0.30
	Кон А	0.30 ± 0.30	0.30 ± 0.30	0.30 ± 0.30	0.30 ± 0.30	0.30 ± 0.30

Примечание. \* — количество клеток в опыте достоверно отличается от контроля ( $P=0.05$ ).

Кон А в популяциях ИМК почек стимулировал более быструю плазматическую реакцию, чем ППД. Максимальное число этих клеток у особей, получивших Кон А, обнаружено на 2-е сут, тогда как у карпов после инъекции ППД — на 8-е сут. Доля плазматических клеток в популяциях ИМК селезенки под влиянием Кон А не менялась. Хотя ППД в селезенке карпов вызывал изменения в содержании доли плазматических клеток, стимулирующий эффект данного митогена на плазматическую реакцию был менее интенсивным, чем таковой

препараты также, как после инъекции бактериального антигена (Микряков, 1968, 1970; Микряков, Балабанова, 1979).

Таким образом, лимфоциты карпа реагируют на Т- и В-специфические митогены подобно иммуноцитам млекопитающих. Эта реакция проявлялась в изменении доли трансформированных лимфоцитов, плазматических клеток, усилении митотической активности. Выявленные различия в реакции лимфоцитов почек и селезенки на исследуемые митогены предполагают существование в организме карпа не менее 2 популяций, эквивалентных Т- и В-клеткам млекопитающих.

Отсутствие типичной реакции трансформации лимфоцитов селезенки в ответ на воздействие Кон А можно объяснить наличием в этом органе только одного типа иммуноцитов, подобных В-клеткам теплокровных животных. Напротив, в почках карпа, вероятно, имеются оба типа этих клеток, что подтверждается реакцией лимфоцитов почек в ответ на воздействие Кон А и ППД. Однако слабая чувствительность клеток к Т-специфическому митогену возможно обусловлена действием низкой температуры ( $16^{\circ}\text{C}$ ), при которой содержались подопытные рыбы.

Распределение иммунокомпетентных клеток в тканях и органах лимфоидной системы карпа отличается от таковой других видов рыб, исследованных ранее. Лимфоциты пронефроса радужной форели (*Salmo gairdneri* Richardson) отвечали реакцией бласттрансформации только на воздействие Т-независимого митогена, липополисахарида (ЛПС), в то время как клетки селезенки реагировали на Т- и В-специфические митогены (Etlinger et al., 1976). Лимфоциты пронефроса ушастого сома (*Lepomis macrochirus* Rafinesque) представляют собой смешанную популяцию, 70% которой чувствительно к Т-специфическим митогенам (ФГА, Кон А) и 25% отвечают на воздействие ЛПС (Cuchens, Clemm, 1977).

Вполне вероятно, что распределение неоднородных в функциональном отношении иммуноцитов в организме рыб носит видоспецифический характер. Выявленные особенности в структурной организации клеточного иммунитета карпа, по сравнению с другими видами рыб, видимо, обусловлены поиском оптимального распределения и местонахождения в процессе эволюции Т- и В-клеток у низших животных.

исхождению антигенами. В организме рыб, видимо, существуют неоднородные в функциональном отношении лимфоциты, подобные Т- и В-клеткам млекопитающих и выполняющие функции распознавания «чужого» или синтеза антител. Об этом, в частности, свидетельствуют данные и наших исследований, проведенные на лимфоцитах карпа по изучению разнообразия антигенреагирующих клеток.

Разнокачественность антигенреагирующих лимфоцитов изучали на иммуноцитах карпа, выделенных из почек, селезенки и периферической крови. В качестве антигена использовали бактерии *Aeromonas punctata*, ЭБ, зимозан и комплекс зимозан+ЭБ. Показано, что антигенреагирующие лимфоциты исследуемых рыб гетерогенны (табл. 7).

Таблица 7

Относительное число антигенреагирующих лимфоцитов в организме карпов, содержащихся при температуре воды 16–19°C, %

Источник антигена	Место локализации лимфоцитов		
	периферическая кровь	мелонефрос	селезенка
Бактерии	13.9±0.3	32.0±1.9	42.0±1.8
Эритроциты барана	—	5.89±0.78	1.33±0.15
Зимозан	—	7.13±0.90	5.96±0.78
Зимозан+ЭБ	—	13.6±1.06	3.78±0.64

Следует отметить, что число лимфоцитов рыб, вступающих в реакцию цитоадгезии с бактериальным антигеном, было больше, чем таковых, вступающих в реакцию с ЭБ, зимозаном и комплексом зимозан+ЭБ. Особенно низким было количество антигенраспознающих клеток к ЭБ, зимозану и комплексу зимозан+ЭБ в популяциях лимфоцитов селезенки. Выявленные различия в составе АГРК, с одной стороны, видимо, отражают экологические особенности рыб и эволюционные отношения между ними, а с другой — функциональную разнокачественность лимфоцитов. Известно, что рыбы обитают в среде, богатой микроорганизмами, в том числе бактериями *Aeromonas punctata* (Афанасьев, 1979; Хуторной, 1989). Кроме того, в рационе карпов существенное место занимают хирономиды, являющиеся переносчиками и резервуарными хозяевами *Aeromonas punctata* (Афанасьев, 1979). Вполне возможно, контакт рыб с этими микробами через корм и воду является одним из факторов, приводящих

отсутствии такого контакта, как это имеет место с ЭБ или зимозаном, число АГРК с мембранными ИМГ против этих антигенов в популяциях иммуноцитов рыб невысокое.

Сравнение результатов, полученных в наших опытах и на теплокровных животных (Гриневич, 1973; Гришина, Мюллер, 1978; Блюгер и др., 1980; Петров, 1982), показало существенное различие в содержании АГРК у этих групп животных. В организме теплокровных животных содержится 50—70% лимфоцитов, реагирующих с ЭБ, зимозаном и комплексом зимозан+ЭБ, у рыб — около 2—14%. Можно предположить, что существующее различие является одной из причин неодинаковой реакции иммунной системы этих животных на чужеродные тела. Известно, что иммунная система рыб реагирует на ЭБ слабее, чем таковая теплокровных животных (Лукьяненко, 1971; Прокопенко, Равич—Щерба, 1974; Van Muiswinkel et al., 1978; Rijkers et al., 1980). Это подтверждается слабой антителообразовательной функцией иммунных ЭБ рыб (Прокопенко, Равич—Щерба, 1974; Rijkers et al., 1980). Если титры гемагглютининов рыб едва достигали 1:64 и 1:100, то у теплокровных они равнялись 1:2560 и выше. Иммунные ЭБ рыбы отличались не только по уровню гемагглютининов, но и по количеству антителосинтезирующих клеток. У иммунных ЭБ карпов количество антителообразующих клеток, определенное из расчета на 1 млн. клеток ЛМС, равнялось 149 (Rijkers et al., 1980), тогда как у иммунных мышей число этих клеток доходило до 12 тыс. и более (Прокопенко, Равич—Щерба, 1974).

**Зависимость антигенреагирующей функции лимфоцитов от присутствия ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ .** Известно, что процесс реагирования лимфоцита с клеткой мишенью или с чужеродным телом зависит от присутствия ионов кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ), магния ( $\text{Mg}^{2+}$ ) и подавляется ингибиторами клеточного метаболизма (Брондз, Рохлин, 1978; Фонталин, Певницкий, 1978; Лебедев и др., 1980; Хаитов, Атауллаханов, 1981; Петров и др., 1983).

Сущность действия ионов  $\text{Ca}^{2+}$  сводится к контролю активности рецепторных участков мембраны лимфоцита с антигенным сигналом и проницаемости плазматических мембран (Петров и др., 1983). Ионы магния необходимы как катализаторы ферментативных процессов, в том числе циклазных ферментов: аденилат- и гуанилатцик-

тов способствует переводу некоммутированных лимфоцитов (неспособных вступить в реакцию с антигеном) в коммутированные, участвующие в процессе узнавания чужеродных тел и реакции бласттрансформации.

Данных по влиянию активаторов рецепторных систем на функционирование антигенраспознающих структур у рыб в доступной литературе нет. Чтобы понять механизмы, регулирующие взаимодействие лимфоцитов с бактериальным антигеном, нами проведено исследование зависимости антигенреагирующей функции этих клеток от присутствия в инкубационной среде ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ .

Установлено, что процесс распознавания зависит от наличия в среде двухвалентных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . (табл. 8).

Таблица 8

Реакция лимфоцитов почек карпа с инактивированными бактериями после связывания  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  этилендиаминтетраацетатом ЭДТА

Условия опыта	Число опытов	Доля антигенреагирующих клеток, %	
		иммунные	неиммунные
В присутствии 1 мМоль ЭДТА	10	$11 \pm 0.09$	$12 \pm 0.2$
Трис буфера без ЭДТА	8	$69 \pm 2.7$	$37 \pm 1.7$
0.05%-ный раствор $\text{Na}_3\text{N}$	7	$5 \pm 0.2$	$7 \pm 0.4$

Количество антигенреагирующих лимфоцитов с бактериями в присутствии хелатора ЭДТА резко падает. Полученные данные позволяют считать, что для осуществления реакции АГРК нуждаются в присутствии двухвалентных ионов ( $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ). Они, по-видимому, выполняют функцию активаторов рецепторных систем и регулируют реакцию взаимодействия АГРК с бактериями. В присутствии хелатора ЭДТА в популяциях лимфоцитов снижается не только доля АГРК, но резко уменьшается число трансформированных лимфоцитов, напоминающих макрофаги (табл. 9).

Таблица 9

Влияние ЭДТА на состав лимфоидных клеток почек карпа, %

Состав иммуноцитов	Опыт	Контроль
Лимфоциты	$39 \pm 2.2$	$36 \pm 1.3$
Лимфобласты	—	$4 \pm 0.2$
Лимфоциты на стадии трансформации	$5 \pm 0.2$	$44 \pm 2.2$
Ретикулярные клетки	$2 \pm 0.1$	$16 \pm 0.6$

В опыте уменьшаются не только трансформированные лимфоциты, но и ретикулярные клетки. В популяциях клеток, обработанных ЭДТА, доля лимфоцитов, находящихся на стадии «покоя», наоборот увеличивается. Присутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , видимо, блокируя процесс взаимодействия антигена с мембранными рецепторами АГРК, препятствует переходу иммуноцитов из фазы покоя G в фазу клеточной трансформации и деления (Хаитов, Атауллаханов, 1981).

В результате этого, вероятно, нарушается образование клеток, осуществляющих функцию разрушения чужеродных тел с синтеза антител. Сходные изменения в характере реагирования АГРК с бактериями получены при культивировании иммуноцитов карпа в присутствии ингибитора метаболической активности клеток — 0.05%-ного азидата натрия.

Таким образом, результаты исследования морфофункциональных характеристик АГРК показали, что функцию распознавания бактериальных тел выполняют лимфоциты, снабженные мембранными рецепторами. Лимфоциты рыб по характеру реагирования на митогены представлены не менее, чем 2 субпопуляциями, характерными для T- и B-клеток млекопитающих. Обнаружен видоспецифический характер распределения этих клеток в организме рыб. По наличию антигенреагирующих рецепторов лимфоциты рыб гетерогенны. Высказано предположение, что интенсивность иммунного ответа определяется наличием в организме достаточного количества АГРК. Выявленное различие в содержании преддетерминированных АГРК к разным по происхождению антигенам в организме рыб и теплокровных животных отражает эволюционные отношения между ними и их экологические особенности. Функция мембранных рецепторов АГРК зависит от ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Их отсутствие или недостаток в организме и в окружающей среде следует считать неблагоприятным для функционирования иммунной системы, в частности, по реализации процессов распознавания и нейтрализации чужеродных тел, вызывающих инфекционные болезни у рыб.

### **Влияние некоторых факторов на содержание антигенреагирующих клеток в организме рыб**

Изменения, происходящие в окружающей среде, оказывают прямое или опосредованное влияние на иммуно-

Лукьяненко, 1971; Микряков и др., 1974; Шлейфер, 1978; Вихман, 1983; Ambrosius, Schäker, 1964; Avtalion, 1969, 1981; Rijkers et al., 1980; Roales, Perlmutter, 1980; O'Neill, 1981). Имеющиеся сведения в основном посвящены анализу реакции иммунной системы рыб в ответ на меняющиеся условия среды обитания по данным определения антителообразовательной функции. Другие функции иммунной системы рыб изучены весьма слабо.

Влияние условий среды на АГРК в организме карпа исследовали при различных температурных условиях и низких значениях рН.

**Содержание АГРК в организме рыб, обитающих при разных температурах.** Известно, что температура воды является одним из ведущих факторов, регулирующих интенсивность биологических процессов, происходящих в водных экосистемах. У рыб в зависимости от температуры среды существенно меняются интенсивность антителогенеза и фагоцитарной активности лейкоцитов (Пучков, 1957; Лукьяненко, 1971; Avtalion 1981; Rijkers et al., 1981). При низких температурах подавляется также антигенразрушающая функция (Трофимова, Микряков, 1973). На основании анализа интенсивности антителогенеза и фагоцитарной активности лейкоцитов рыб Авталионом (Avtalion, 1981) высказано предположение, что при низких температурных условиях содержания меняется либо доля клеток супрессоров, подавляющих функции иммунитета, либо характер взаимодействия между макрофагами и клетками помощниками, осуществляющими передачу иммуногена предшественникам антителообразующих клеток.

Таблица 10

Относительное содержание АГРК в ретикуло-лимфойдной ткани почек карпов, %

Температура, °С	Иммунные	Интактные
4	19±0.9	5±0.1
15	62±3.0	20±2.8
22	77±4.7	38±3.4
26	75±5.1	49±4.4

Между тем существенная роль в изменении иммунологической реактивности рыб, вероятно, принадлежит содержанию АГРК, осуществляющих распознавание и



образование макрофагов (табл. 10). Полученные материалы показали, что у рыб при температуре 4°C резко снижается доля АГРК, и наоборот, при температуре 22—26°C — повышается. Степень изменчивости исследуемого показателя зависит от иммунизации рыб. У предварительно иммунизированных карпов различия в содержании бактериальной АГРК при разных температурах колеблются менее чем в 4 раза, а у интактных — в 10 раз.

Популяция бактериальных АГРК в организме карпа, вероятно, состоит из устойчивых и чувствительных к воздействию низкой температуры воды субпопуляций. С понижением температуры воды за пределы толерантной (оптимальной) для данного вида рыб происходит элиминация низкотермочувствительных АГРК, и наоборот, с повышением температуры воды доля этих клеток в организме рыб повышается. Выявленные различия в характере реагирования АГРК у иммунных и неиммунных особей позволяют предполагать, что иммунизация индуцирует образование устойчивых и чувствительных к низкой температуре АГРК. Не исключено, что колебание АГРК в организме рыб при разных температурах происходит за счет изменения активности рецепторного аппарата этих клеток. Вполне возможно, что при низких температурах подавляется функция рецепторов у большинства АГРК. Выявленное различие в уровне содержания АГРК при разных температурах позволяет высказать предположение, что интенсивность разрушения чужеродных тел, образования антителосинтезирующих клеток определяется исходным количеством антигенраспознающих клеток.

**Влияние низких значений рН на содержание АГРК в организме карпа.** Известно, что рН воды играет существенную роль в жизнедеятельности водных животных (Виноградов и др., 1979). Колебания концентраций водородных ионов в водоеме оказывают отрицательное влияние на водных животных. При снижении (закислении) рН воды за пределы оптимальной для водных животных увеличивается смертность рыб и снижается продуктивность водоема. Выяснению механизмов действия низких значений рН на водных животных и поиска путей предотвращения отрицательных воздействий закисления воды на флору и фауну водоемов в настоящее время уделяется огромное значение (Виноградов и др., 1979). Сведения о влиянии данного экологического фактора на иммунофизиологическое состояние рыб в литературе

рыб появляются эпизоотии костноза, сапролегниоза и болезни Стаффа (Бауер, 1959; Канаев, 1973; Бауер и др., 1977; Schäregclaus, 1954, 1979), косвенно свидетельствующие об изменении иммунологической реактивности рыб.

Мы изучали содержание бактериальных АГРК у рыб, находящихся при низких значениях рН воды. Опыты ставили на двухлетках карпа, в непроточных аквариумах при рН=4.7 и температуре воды 16—18°C. Необходимую величину рН в опытах поддерживали автоматическим титрованием воды, разбавленной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> с помощью БАТ-15. Содержание АГРК устанавливали через 15 сут после посадки рыб в опытные аквариумы.

Под влиянием низких значений рН у рыб нарушается иммунологическое состояние. У них уменьшается содержание АГРК и лимфоцитов (табл. 11).

Таблица 11

**Влияние рН воды (4.7) на содержание лимфоцитов и АГРК в 1 млн лейкоцитов, тыс. кл.**

Место концентрации клеток	Лимфоциты		АГРК	
	опыт	контроль	опыт	контроль
Мезонефрос	$4.3 \times 10^4 \pm \pm 1.8 \times 10^3$	$7 \times 10^4 \pm \pm 2.4 \times 10^3$	$12.5 \times 10^3 \pm \pm 3 \times 10^3$	$26.6 \times 10^3 \pm \pm 4 \times 10^3$
Селезенка	$3.9 \times 10^4 \pm \pm 2.5 \times 10^3$	$41 \times 10^4 \pm \pm 7.3 \times 10^3$	$5.4 \times 10^3 \pm \pm 1.2 \times 10^3$	$11.1 \times 10^4 \pm \pm 8 \times 10^3$

Степень снижения иммуноцитов в селезенке была выражена сильнее, чем в почках.

Таким образом, количественное содержание бактериальных АГРК в организме рыб не является величиной постоянной. В зависимости от условий среды их число колеблется. При воздействии на рыб неблагоприятных для их жизнедеятельности факторов содержание АГРК уменьшается. Установленное различие в содержании этих клеток у рыб свидетельствует, что АГРК представлены не менее чем 2-мя субпопуляциями: чувствительными и устойчивыми к повреждающим действиям экологических факторов клеток. Данные этих опытов свидетельствуют о возможности использования АГРК в качестве клеток «мишеней» при оценке реакции иммунной системы рыб в ответ на воздействие неблагоприятных (стресс) факторов среды. Угнетающее действие стресс-раздражителей на напряженность активно приобретенного и естественно-

и инвазионным болезням, вероятно, определяется снижением доли содержания АГРК.

### Особенности распределения и концентрации антигенраспознающих клеток в организме

Большинство литературных данных посвящено исследованию реакции лимфоцитов в розеткообразовании с эритроцитами барана (Chiller et al., 1969a, 1969b; Lewis et al., 1979; Wratwell, Perish, 1980). Используя метод иммуноцитoadгезии, вначале Лэвис с соавторами (Lewis et al., 1979), затем Гостинг с соавторами (Gosting et al., 1981) исследовали АГРК по отношению к бактериям в периферической крови канального сомика и нерки. Ими показано, что только 8% лимфоцитов у канального сомика и 10—12% — у нерки имели антигенраспознающие рецепторы к антигенам бактерий *Aeromonas hydrophilla* и *Vibrio anguillarum*. Иммунизация приводит к нарастанию антигенреагирующих лимфоцитов периферической крови до 50—70% по сравнению с контролем (Gosting et al., 1981). Других сведений, касающихся особенностей распределения и концентрации бактериальных антигенраспознающих клеток, в существующей литературе нет. Используя модифицированный метод бактериальной цитoadгезии по Льюис с соавторами (Lewis et al., 1979) данный вопрос изучали на двухлетках карпов и карасей. В опытах использовали по 10 интактных и 10 иммунизированных особей. Иммунизацию рыб осуществляли внутрибрюшинно убитыми формалином бактериями *Aeromonas ripictata* в дозе по 0.5 мл, соответствующей 1 млрд. микробных тел. Материал собирали через 20—21 сут после иммунизации рыб. Клетки учитывали в 25 полях зрения.

Показано, что в организме исследуемых рыб существуют преддетерминированные к используемым микробам АГРК. Относительное содержание этих клеток в зависимости от вида рыб и ткани колеблется в пределах 13—51% (табл. 12).

Таблица 12

Распределение антигенреагирующих клеток в организме рыб, %

Ткани и органы	Карп		Карась	
	интактные	иммунные	интактные	иммунные
Кровь	13.0±0.2	25±1.1	15.0±0.25	24±0.7
Почки	32.2±1.9	68±4.2	40.1±2.0	81±3.2

Минимальное число антигенреагирующих клеток выявлено в периферической крови (13—15%), максимальное — в селезенке (36 и 51%). В тканях и органах карасей доля антигенраспознающих клеток в популяциях лейкоцитов была больше, чем у карпов. Независимо от видовых особенностей рыб предварительная иммунизация приводит к нарастанию антигенреагирующих клеток более чем в 1.5—2 раза (табл. 12). Основным местом концентрации антигенреагирующих клеток являются органы и ткани, богатые клетками ЛМС (или РЭС). Такими органами у рыб являются селезенка, почки, тимус, стенка кишечника, лейдигов орган (у круглоротых), околосоудочная полость, область головного мозга (у хрящевых ганойдов) и жировая ткань в области хорды у круглоротых (Румянцев, 1939; Заварзин, 1945; Хохлова, 1974; Fänge, 1982; Ellis, 1977; Zarata 1983). Следует отметить, что, в отличие от высших позвоночных, у рыб отсутствуют лимфатические узлы и костно-мозговая ткань. Круглоротые и рыбы хотя и имеют лимфатическую систему, но ткани данной системы в организме этих животных не образуют специализированных скоплений, как это имеет место у теплокровных животных.

Таким образом, впервые установлено, что функцию распознавания микроорганизмов в организме рыб осуществляют преддетерминированные лимфоциты, снабженные антигенреагирующими рецепторами. Процесс распознавания и восприятия антигена связан с появлением большого количества эффекторных клеток в месте локализации чужеродных тел и адгезией их на антигенреагирующих клетках. Интенсивность появления и реагирования иммуноцитов с бактериальным антигеном зависит от функционального состояния организма рыб и патогенных свойств микробов. У иммунных рыб повышается общее число АГРК и их функциональная активность. Изменения, происходящие в количественном содержании АГРК и их функциональной активности, у иммунных особей свидетельствуют о морфофизиологических перестройках, осуществляющихся в иммунной системе рыб. Эти перестройки, видимо, имеют адаптивное значение и направлены на повышение иммунологической реактивности рыб. Противоположные результаты нами получены при анализе АГРК у особей, подвергнутых воздействию низких значений рН (5.0), и у рыб, содержащихся при температуре воды 4°C, а также после введения

температуре воды 26°C, содержание АГРК нарастает. Выявленные закономерности свидетельствуют о двух субпопуляциях АГРК: чувствительных и устойчивых к повреждающим действиям экологических факторов. Функция АГРК зависит от присутствия в среде инкубации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  и метаболической активности клеток. Лимфоциты рыб по характеру взаимодействия с разными по происхождению антигенами гетерогенны и отличаются от таковых теплокровных животных низким содержанием АГРК к одному и тому же антигену. Лимфоциты рыб отличаются также реакцией на митогены, специфичные для Т- и В-лимфоцитов млекопитающих. Распределение лимфоцитов, аналогов Т- и В-клеток млекопитающих, у карпа отличается от других видов рыб, что, возможно, обусловлено поиском оптимального местонахождения Т- и В-клеток у низших позвоночных.

Показана связь между динамикой изменения АГРК в очаге концентрации чужеродных тел и появлением функционально активных макрофагов в зависимости от условий среды обитания и иммунизации рыб. Парентерально введенные иммуносупрессивные гормоны и вирулентные микроорганизмы в организме рыб подавляют процессы трансформации АГРК. Высказано предположение, что АГРК после адгезии на ее клеточной поверхности, в отличие от теплокровных животных (Покровский с соавторами, 1979; Земсков, 1983), превращается в антигенразрушающую клетку. У теплокровных животных эта клетка первоначально инициирует появление макрофагов в очаге концентрации микроорганизмов, а затем осуществляет передачу чужеродных тел антигенразрушающим клеткам.

### **Глава III. МЕТАБОЛИЗМ БАКТЕРИАЛЬНОГО АНТИГЕНА В ОРГАНИЗМЕ РЫБ**

Под метаболизмом понимают совокупность химических реакций, протекающих в живых клетках и обеспечивающих организм веществами и энергией для его жизнедеятельности, роста и размножения. Он связан с процессами превращения веществ внутри клетки от момента их поступления и до образования конечных продуктов.

определяют темп и характер всех видов обмена: пластического, энергетического и генеративного. В основе метаболизма лежат взаимосвязанные процессы катаболизма и анаболизма, определяющие судьбу питательных веществ (Noshaska, 1977).

Если многие стороны метаболизма простых веществ с небольшой молекулярной массой, не обладающие антигенными свойствами, изучены достаточно полно, то сведения о качественных и количественных превращениях антигена в организме рыб в доступной литературе практически отсутствуют. Анализ литературных данных показывает, что парентерально введенные чужеродные тела подвергаются фагоцитозу (Мечников, 1903; Микряков, 1964а; Гончаров, 1966, 1967; Лукьяненко, 1971; Микряков и др., 1974; Fin, Nielson, 1971; Avtalion, 1981; Honda et al., 1985; Oliver et al., 1986). В результате фагоцитоза бактерии в организме рыб подвергаются гидролитическому расщеплению до углекислоты и неидентифицированных органических веществ (Флеров, Романенко, 1969, 1970). Вместе с тем, вопросы, касающиеся особенностей разрушения патогенных микробов в организме рыб и выведения продуктов их распада из организма рыб, долгое время оставались не разработанными. Не было данных о факторах, регулирующих интенсивность разрушения антигена иммунной системой у разных по экологии видов рыб.

В настоящей главе излагаются результаты многолетних исследований антигенразрушающей функции иммунной системы некоторых пресноводных рыб по данным изучения выведения продуктов распада патогенных и непатогенных бактерий из организма и распределения органического вещества бактерий в тканях и органах. Исследование этих вопросов проведено с помощью меченых по  $^{14}\text{C}$  бактерий (Микряков, 1965, 1966, 1970в; Гончаров и др., 1966; Микряков, Гончаров, 1970; Микряков, Флеров, 1970; Трофимова и др., 1973, 1978; Трофимова, Микряков, 1973, 1978; Микряков, Трофимова, 1975).

### **Разрушение бактерий и выведение продуктов их распада из организма**

Для понимания механизмов, способствующих восстановлению биологического постоянства внутренней среды при бактериальном инфицировании и иммунизации рыб, необходимо рассмотреть вопрос о катаболизме бактерий

Исследование провели на 3 видах рыб (окунь, карась и карп) с помощью меченых по  $^{14}\text{C}$  бактерий. Первоначально, используя авторадиографический метод учета  $^{14}\text{C}$  бактерий, показали, что радиоактивный углерод бактерий в каком-то видоизмененном виде выводится из организма карпов через кожу, желудочно-кишечный тракт и с мочой (Микряков, 1965, 1966; Гончаров и др., 1966). Затем интенсивность процессов разрушения патогенных и непатогенных микробов в организме разных видов рыб и факторов, влияющих на них, исследовали с помощью метода В. И. Романенко и Б. А. Флерова (1969).

Сравнивая полученные результаты по выведению продуктов распада, следует отметить, что все используемые в опытах виды микробов подвергаются парентеральному пищеварению до углекислоты и неидентифицированных органических веществ. Однако, несмотря на имеющееся сходство в разрушении разных по патогенным свойствам бактерий, выявлены существенные различия в скорости деструкции этих микробов в организме рыб (рис. 15, 16). Их трех видов бактерий автотрофные микроорганизмы разрушались интенсивнее, чем возбудители аэромоназа и бактерии *Bacterium prodigiosum*. Выведение продуктов распада автотрофных водородокисляющих бактерий *Hydrogenomonas facilis*, по сравнению с элиминацией *Bacterium prodigiosum* из организма карасей и *Aeromonas punctata* из организма карпов, происходило интенсивнее. За 10 сут из организма карасей и карпов в составе углекислоты выделяется по 10.5 и 10.8%  $^{14}\text{C}$  бактерий *Hydrogenomonas facilis*, а  $^{14}\text{C}$  бактерий *Bacterium prodigiosum* и *Aeromonas punctata* соответственно на 3 и 5% меньше. Выделение меченого углерода в составе слизи, мочи и кала после введения обоих видов бактерий было в 2—3 раза меньше, чем в составе углекислоты. При прочих равных условиях  $^{14}\text{C}$  *Hydrogenomonas facilis* в виде неидентифицированных органических веществ из организма рыб выделяется в 2 раза больше по сравнению с  $^{14}\text{C}$  *Aeromonas punctata*. Количество  $^{14}\text{C}$  *Hydrogenomonas facilis*, обнаруженное в составе органических веществ, за 10 сут в среднем равнялось 6.3%, а *Aeromonas punctata* — 2.6% от общего количества введенных в организм рыб бактерий. Продукты распада меченых бактерий при дыхании выводятся более интенсивно, чем с неидентифицированными продуктами экскреции, выделяемыми через кожу, кишечный тракт и моче-

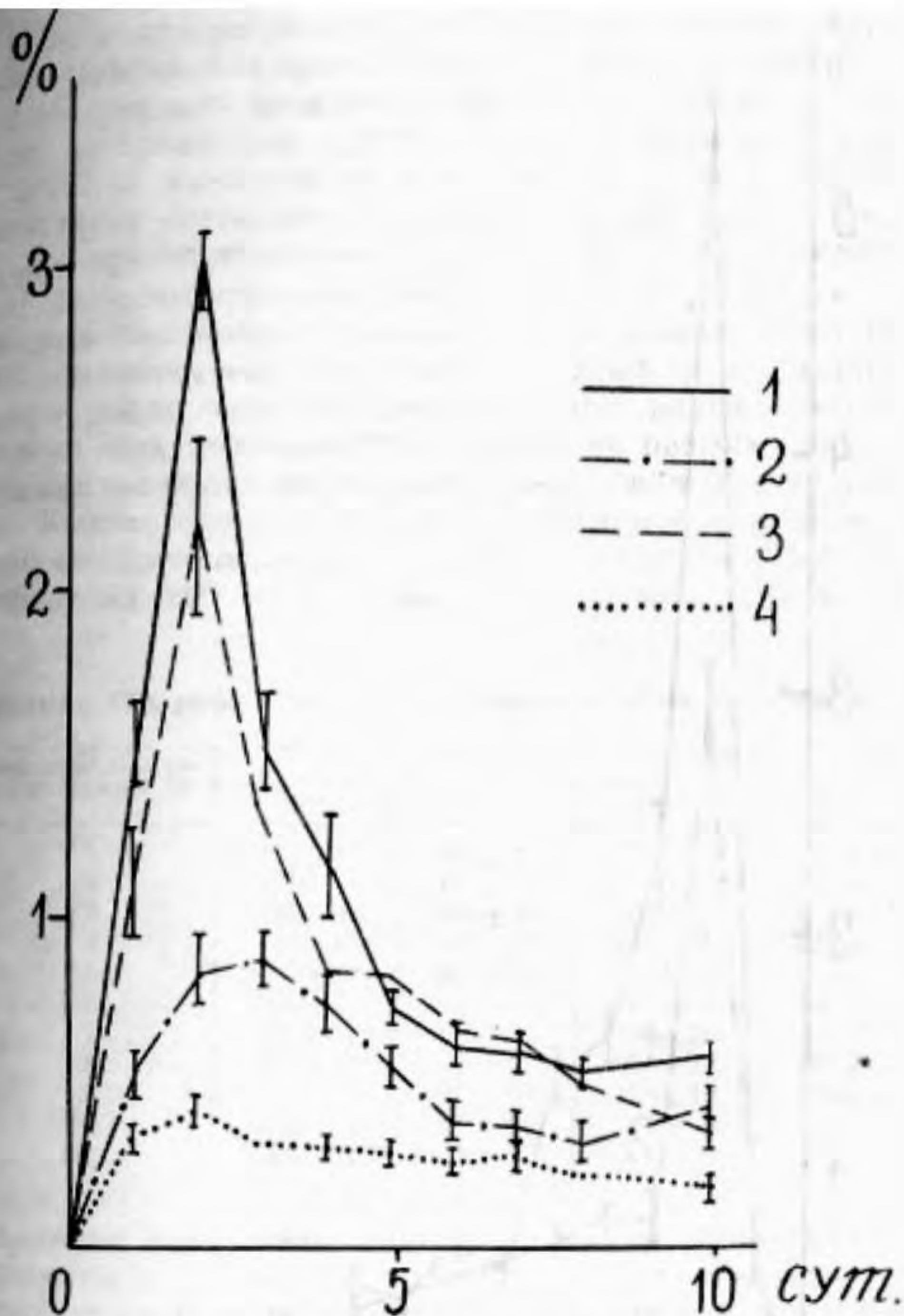


Рис. 15. Выделение продуктов распада бактерий из организма карпов.

1 — выделение  $^{14}\text{C}$  *Hydrogenomonas facilis* в составе углекислоты, 2 — то же органических веществ, 3 — выделение  $^{14}\text{C}$  *Aeromonas punctata* в основе углекислоты, 4 — то же органических веществ. По оси ординат — количество выделившегося  $^{14}\text{C}$ , % от введенного, по оси абсцисс — время анализа, сут.

из организма  $^{14}\text{C}$  бактерий обнаружено на 2-е сут. Выделение радиоактивного углерода в составе слизи, мочи и кала было более равномерно и меньше, чем в составе



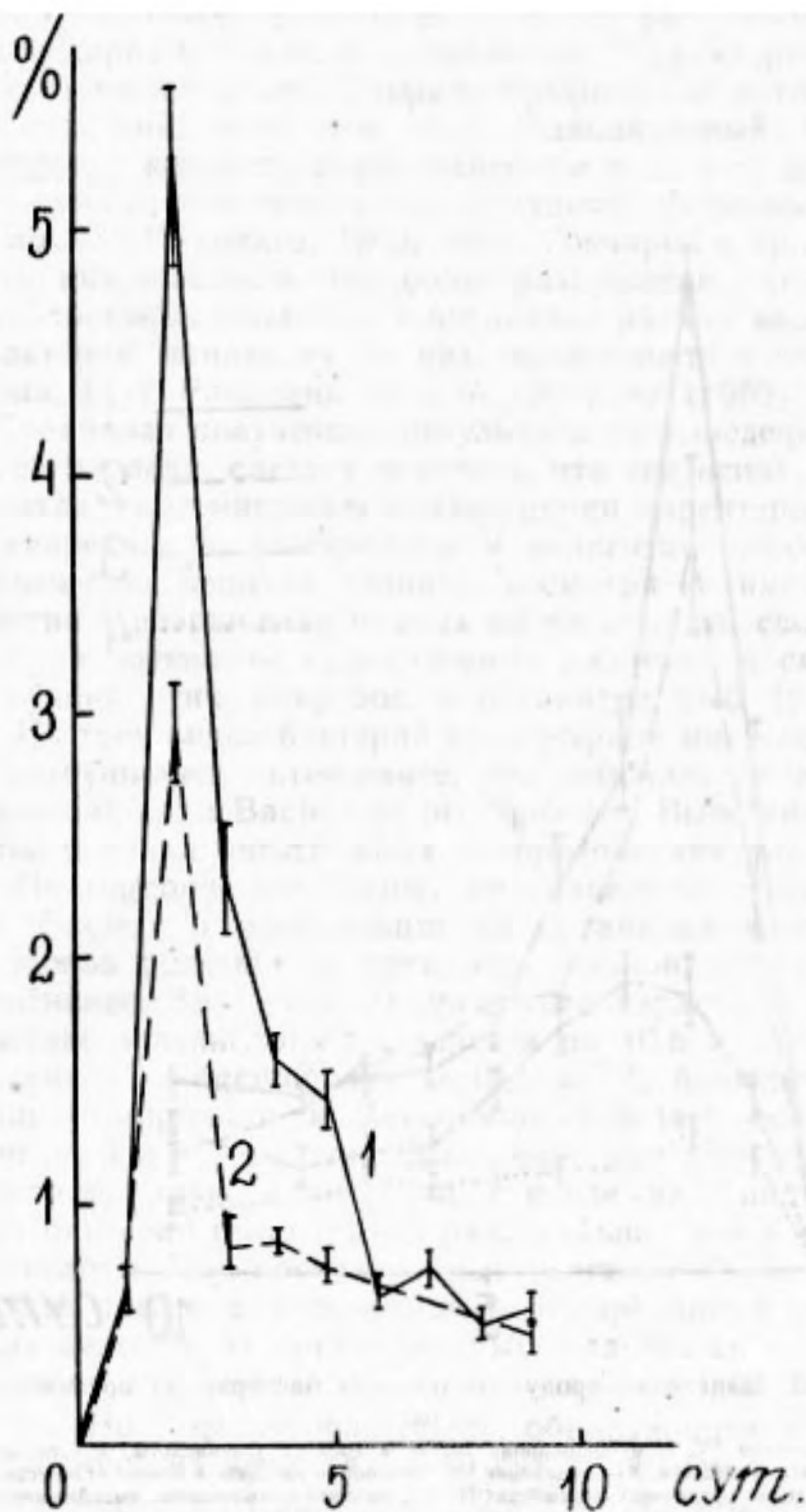


Рис. 16. Выделение продуктов распада бактерий *Hydrogenomonas facilis* (1) и *Bacterium prodigiosum* (2) при дыхании у карасей.

Активность антигенразрушающих структур по отношению к разным бактериям проявляется неодинаково. Различная скорость выведения продуктов разложения бактерий из организма одного и того же вида рыб может зависеть от скорости обменных реакций, интенсивности фагоцитоза клетками лимфоидно-макрофагальной системы и морфофункциональной характеристики микробов.

В целях определения зависимости интенсивности разрушения бактерий от уровня общего обмена нами изучена динамика выведения общей углекислоты у карпа и карася после введения им различных видов бактерий. Установлено, что скорость разрушения разных бактерий в организме обоих видов зависит от уровня общего дыхания. Количество углекислоты, выделяемое при дыхании в течение всего периода наблюдения, у карася колебалось в пределах 200 мг/л, у карпа — 410 мг/л (табл. 13).

Таблица 13

Выделение  $\text{CO}_2$  рыбами до и после введения меченых бактерий, мг/сут

Время после введения меченых бактерий, сут	Карп		Карась	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
1	375±18	401±8	231±22	220±15
2	431±28	447±36	217±29	227±12
3	445±32	481±24	201±29	218±15
4	377±18	417±33	210±20	225±17
5	400±39	461±26	212±27	21±9
6	296±29	415±35	180±26	200±13
7	407±37	418±26	198±25	—
8	298±14	419±27	201±22	221±18
9	—	397±34	196±18	215±14
10	365±29	381±30	202±19	—
12	382±31	—	—	—

Сравнивая полученные данные по выделению общей углекислоты у разных групп рыб, следует отметить, что у карася уровень общего дыхания после инъекции бактерий не меняется, тогда как у карпа — повышается, вследствие чего количество углекислоты, выделяемое на 2—3-е сут после введения микробов, увеличивается в среднем на 70—80 мг/л. Интенсивность деструкции бактерий в организме рыб прежде всего зависит от строения бактерий и возможностей катаболических ферментов фагоцитарной системы разрушать разные по структуре органические вещества и организмы. Более медленное выведение продуктов распада *A. punctata* из организма

ся по сравнению с автотрофными бактериями, возможно, обусловлено строением их клеточной оболочки и меньшей чувствительностью к воздействию внутриклеточных ферментов клеток, поглотивших их.

Интенсивность разрушения и выведения продуктов распада одного и того же вида бактерий в некоторых случаях, по-видимому, зависит также от видовых особенностей рыб. У окуня водородокисляющие бактерии разрушаются быстрее, чем у карпа (рис. 17). За 10 сут у окуня выделяется около 25% введенного количества  $^{14}\text{CO}_2$  и около 14% неорганических веществ, в то время как у карпа соответственно около 11 и 5%, т. е. эффективность действия гидролитических ферментов иммунной системы у разных по биологии рыб отличается.

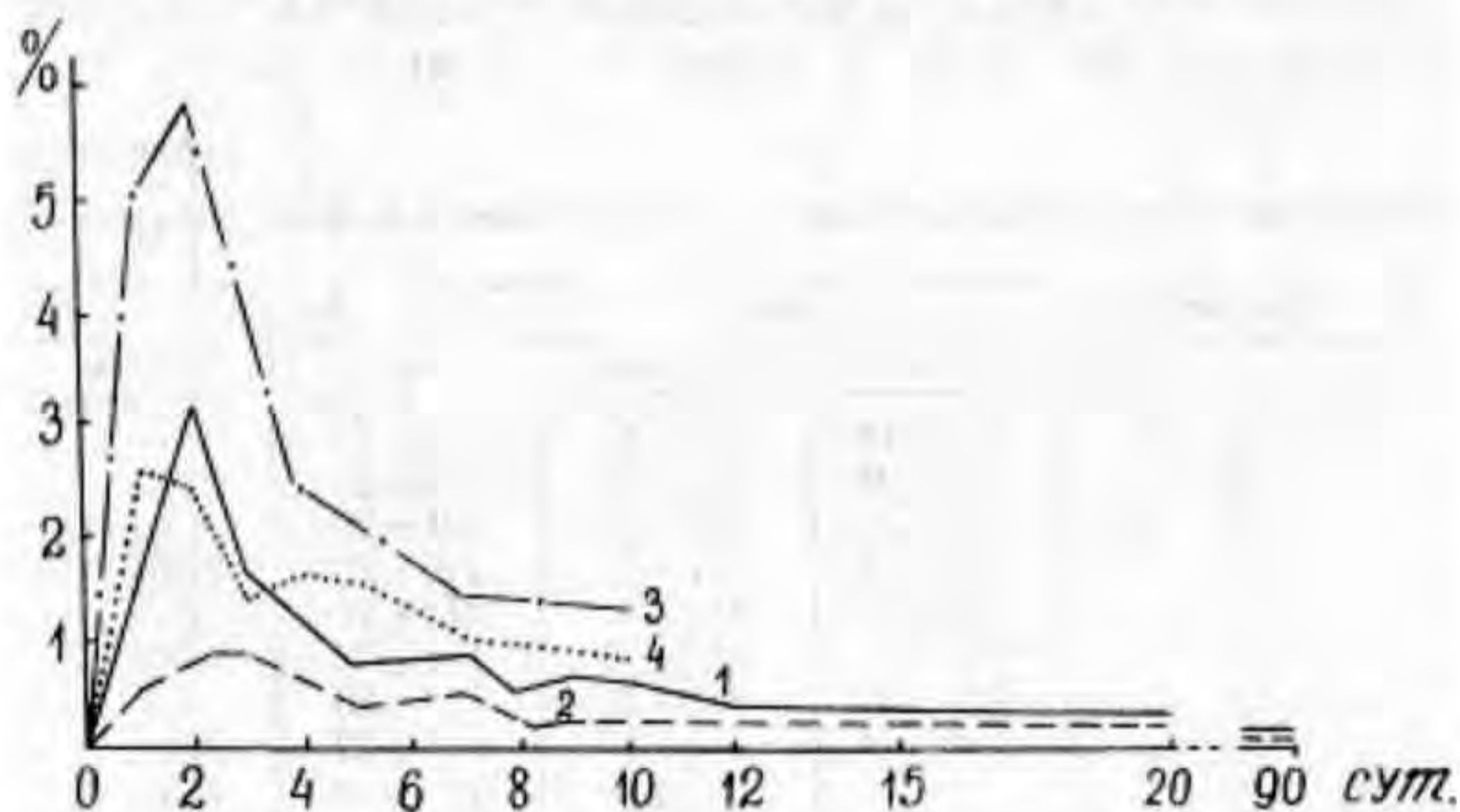


Рис. 17. Выделение продуктов распада у карпа (1, 2) и окуня (3, 4). 1, 3 — выделение в виде  $^{14}\text{CO}_2$ , 2, 4 — то же в виде неидентифицированных продуктов экскреции.

Обозначения осей те же, что и на рис. 15.

Таким образом, нами установлено, что парентерально введенные микроорганизмы подвергаются гидролитическому расщеплению до углекислоты и неидентифицированных органических веществ. Характер динамики выведения автотрофных бактерий находится в полном соответствии с данными Б. А. Флерова и В. И. Романенко (1969, 1970) на карасях. Различные по биологии микроорганизмы в организме рыб разрушаются с различной интенсивностью. Основная масса продуктов разложения бактерий элиминировается при дыхании. Через жабры выво-

65—75% от общего количества выделившегося  $^{14}\text{C}$  бактерий. Остальная часть меченого углерода удаляется в составе неидентифицированных веществ через почки, кишечный тракт и кожу.

Из организма рыб элиминируется не вся часть введенных бактерий. У окуня через 10 сут остается около 61%  $^{14}\text{C}$  *Hydrogenomonas facilis*, у карпа и карася — 84%. Это говорит о том, что после разрушения катаболическими ферментами часть продуктов распада бактерий включается в анаболические процессы, принимает участие в конструктивном обмене и, возможно, в иммунологических реакциях.

### Распределение органического вещества микробов в тканях и органах

Чтобы понять, в каких тканях и органах задерживается  $^{14}\text{C}$  бактерий, параллельно с изучением особенностей разрушения бактериального антигена в организме рыб исследовали распределение меченого углерода микроорганизмов в тканях и органах и степень их участия в синтетических процессах (Микряков, 1965, 1966; Гончаров и др., 1966; Микряков, Гончаров, 1970; Микряков, Флеров, 1970; Трофимова, Микряков, 1973, 1978; Трофимова и др., 1978). Опыты ставили на 6 видах рыб (окунь, щука, плотва, лещ, карась и карп). В качестве тест-микробов использовали меченые по  $^{14}\text{C}$  водородокисляющие бактерии возбудителей аэромоноза *Aeromonas punctata* и грибов *Candida albicans*. Выясняли не только особенности распределения  $^{14}\text{C}$  бактерий в тканях и органах, но и выявляли участие углерода бактерий в синтетических процессах.

Используя первоначально автордиографический метод учета  $^{14}\text{C}$  бактерий в тканях и органах рыб (Микряков, 1965, 1966; Гончаров и др., 1966; Микряков, Гончаров, 1970), а затем метод прямого учета радиоактивности под торцовым счетчиком Гейгера и гомогекатах тканей и органов (Микряков, Флеров, 1970; Трофимова и др., 1973, 1978; Трофимова, Микряков, 1978), показали, что органическое вещество в организме рыб распределяется неравномерно. Независимо от вида рыб наибольшее количество  $^{14}\text{C}$  бактерий на единицу массы во всех случаях зарегистрировано нами в органах, богатых клетками ретикуло-лимфоидной ткани: почках, селезенке, стенке кишечника (табл. 14).

Содержание  $^{14}\text{C}$ -бактерий *Hydrogenomonas facilis* в тканях рыб через сутки после введения, % от введенного на 1 г ткани

Название ткани, органа	Карп	Плотва	Карась	Лещ	Окунь	Щука
Кровь	$0.9 \pm 0.1$	$1.1 \pm 0.1$	$0.7 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.1$	$1.2 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.1$
Селезенка	$2.6 \pm 0.3$	$1.9 \pm 0.3$	$11.1 \pm 1.3$	$2.0 \pm 0.3$	$17.5 \pm 3.3$	$3.5 \pm 0.6$
Почки	$5.1 \pm 1.4$	$3.6 \pm 0.5$	$5.8 \pm 1.1$	$1.3 \pm 0.2$	$6.7 \pm 0.7$	$2.3 \pm 0.1$
Печень	$1.0 \pm 0.1$	$1.5 \pm 0.2$	$4.8 \pm 1.2$	$1.9 \pm 0.04$	$6.7 \pm 1.1$	$1.5 \pm 0.2$
Желчь	$1.7 \pm 0.3$	$3.1 \pm 0.6$	$2.1 \pm 0.4$	$1.8 \pm 0.5$	$6.3 \pm 1.3$	$1.9 \pm 0.3$
Стенка кишечника	$0.7 \pm 0.1$	$1.3 \pm 0.3$	$5.2 \pm 1.3$	$0.6 \pm 0.1$	$2.3 \pm 0.6$	$2.8 \pm 0.9$
Мышцы	$0.1 \pm 0.02$	$0.1 \pm 0.05$	$0.1 \pm 0.05$	$0.03 \pm 0.01$	$0.1 \pm 0.04$	$0.04 \pm 0.01$
Мозг	$0.4 \pm 0.06$	$0.3 \pm 0.06$	$0.3 \pm 0.1$	$0.2 \pm 0.03$	$0.5 \pm 0.06$	$0.1 \pm 0.02$

почках исследуемых рыб мы объясняем тем, что почки рыб, в отличие от высших позвоночных животных, в основном состоят из клеток лимфоидно-макрофагальной или иммунной системы (Smith et al., 1967; Fänge, 1982; Zarata, 1983). Около 70% представлены ретикуло-лимфоидной тканью и только 30% занимают мочевые каналы, клубочки и мочеточники (Torí, 1955). Почки рыб, в отличие от млекопитающих, состоят из 3 отделов: переднего (пронефрос), туловищного (мезонефрос) и хвостового (метанефрос). В пронефросе рыб отсутствуют какие-либо структуры и образования, выполняющие выделительную функцию. Данный отдел почек состоит из ретикуло-лимфоидной ткани (Smith et al., 1967) и надпочечников (Межнин, 1972, 1976).

Несмотря на высокую концентрацию  $^{14}\text{C}$  бактерий в тканях почек в расчете на 1 г массы органа, общее количество поглощенного ими радиоактивного углерода микробов, по сравнению с другими органами, невелико. Например, если в 1 г почек через 24 ч у различных по биологии видов в среднем обнаружено от 1.3 до 6.7% введенного на 1 г массы рыбы  $^{14}\text{C}$  бактерий, то во всем органе — от 5.5 до 12% (табл. 15). По количеству поглощенного  $^{14}\text{C}$  бактерий на 1 г массы почек исследуемые рыбы располагаются в следующем порядке: окунь, карась, карп, плотва, щука и лещ. В зависимости от массы органа наибольшее количество  $^{14}\text{C}$  бактерий обнаружено в почках щуки, затем карпа, плотвы, карася, леща и окуня. Роль и значение данного органа в нейтрализации и разрушении бактериального антигена колеблется в зависимости от видовых особенностей. Эти различия по-

Ткань, орган	Карп	Плотва	Карась	Лещ	Окунь	Щука
Кровь	15.0±1.3	16.2±3.1	3.2±0.5	12.7±2.6	8.8±1.5	12.3±1.2
Селезенка	4.1±0.4	1.4±0.2	2.6±0.6	5.2±1.2	7.3±1.7	2.9±0.9
Почки	10.2±1.8	10.1±2.8	7.2±0.6	6.8±2.0	5.5±1.2	12.2±1.5
Печень	25.2±2.5	15.7±3.8	60.1±13.9	39.8±16.9	35.1±7.3	19.5±2.4
Желчь	—	2.2±0.5	2.0±0.8	4.6±2.1	2.9±0.6	2.2±0.5
Стенка кишечника	6.4±0.7	11.7±2.9	10.1±3.6	17.5±7.2	17.6±2.8	38.0±10.2
Мышцы	37.9±3.3	42.3±12.0	13.4±3.6	12.8±6.5	21.6±6.4	12.1±6.3
Мозг	0.7±0.1	0.3±0.07	0.6±0.2	0.5±0.2	0.9±0.1	0.3±0.04

мающих и антигенразрушающих клеток в 1 мг органа.

Значительное количество задержавшегося  $^{14}\text{C}$  бактерий в селезенке рыб мы также объясняем наличием в данном органе большого числа антигенреагирующих, антигенразрушающих клеток, выполняющих важную роль в иммуногенезе и поддержании постоянства внутренней среды организма при бактериальном инфицировании. Селезенка рыб, согласно современным представлениям, по своим морфологическим и функциональным характеристикам аналогичны таковой высших позвоночных. В селезенке рыб выявлены все типы макрофагальных и лимфоидных клеток, обладающих фагоцитарной активностью и выполняющих функцию антителообразования (Вихман, Генералова, 1974; Untu, 1974).

Поглотительная активность тканей селезенки разных видов сильно варьирует, что, вероятно, также связано с наличием неодинакового количества иммунокомпетентных клеток. В тканях селезенки окуня на 1 мг массы обнаружено  $^{14}\text{C}$  бактерий в несколько раз больше, чем у карася, щуки, карпа, леща и плотвы (табл. 14). Данные анализа удельной радиоактивности селезенки разных видов свидетельствуют, что в селезенке окуня и карася концентрация иммунокомпетентных клеток выше, чем у других видов рыб. Удельное значение данного органа в иммунологическом гомеостазе, как и почек, у разных по биологии видов колеблется. В зависимости от массы селезенки у плотвы задерживается 1.43% от введенного  $^{14}\text{C}$  бактерий, у окуня — 7.28%. При микроавторадиографическом исследовании показано, что  $^{14}\text{C}$  бактерий концентрируется не только в ретикулярных клетках, но и на эритроцитах рыб (рис. 18). По всей вероятности, эритроциты рыб, как и у млекопитающих, в некоторых случаях

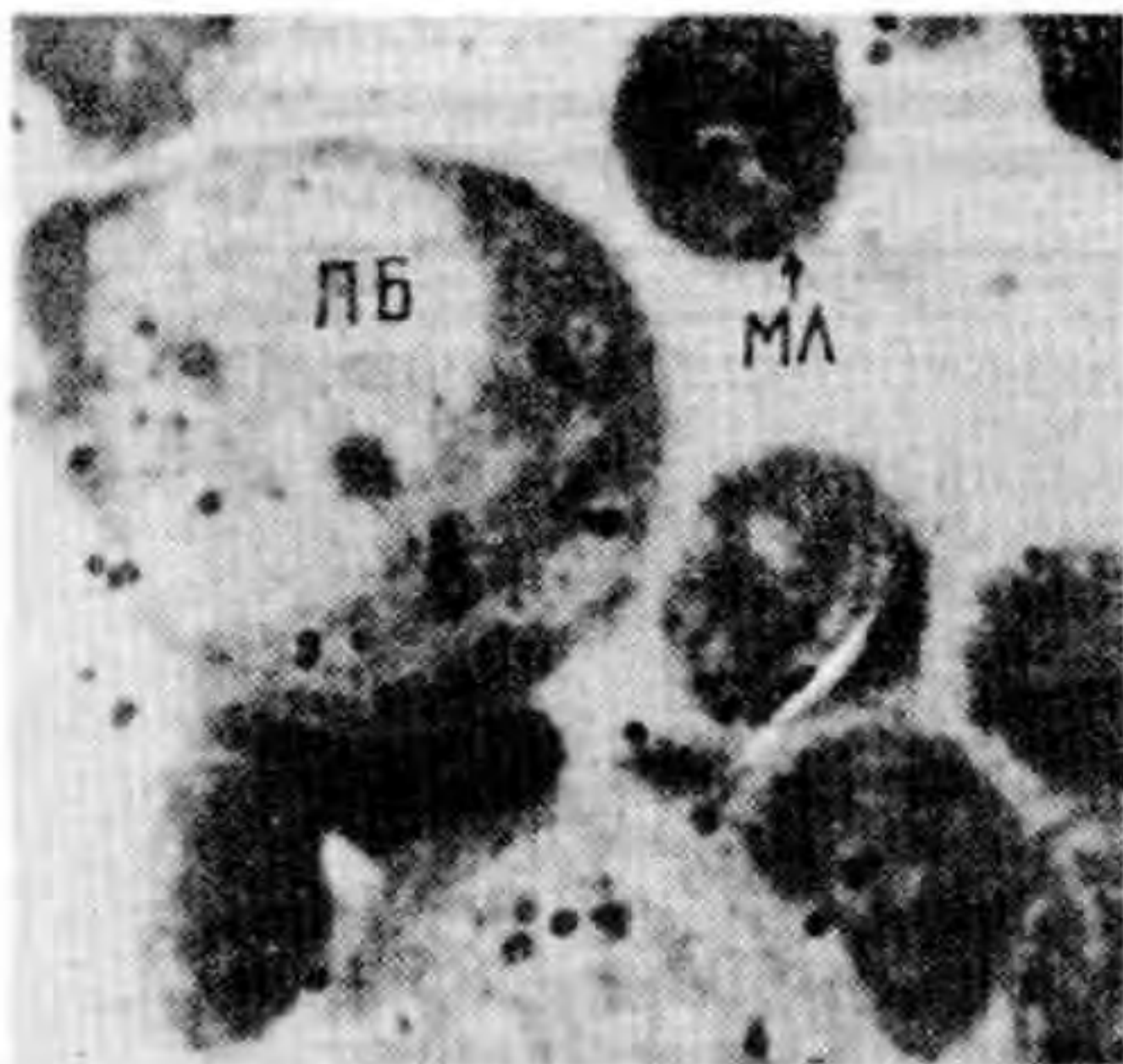


Рис. 18. Микроавторадиографы иммунокомпетентных клеток. МЛ — малый лимфоцит, Г — гранулоцит, ЛБ — лимфобласт, ПБ — плазмобласт, ПК — плазматические клетки, РКМ — ретикулярный макрофаг. Окраска по Романовскому-Гимза; ок.  $\times 10$ , об.  $\times 125$ .

участвуют в иммунологических процессах (Соколова, Аркадьева, 1972).

Печень рыб, как и высших позвоночных животных (Высокович, 1954), обладает значительной адсорбционной способностью. В 1 г печени в зависимости от вида рыб задерживается от 1 до 6.7% введенных бактерий. У окуня в 1 г печени  $^{14}\text{C}$  бактерий задерживается на

Частота встречаемости иммунокомпетентных клеток в тканях различных органов карпа (на 0.1 мм<sup>2</sup> мазка-отпечатка), %

Орган	Сумма всех клеток	Клетки лимфоидного ряда	Бласты	Зрелые и незрелые плазматические клетки	Ретикулярные клетки	Гранулоциты
Почки	67±1.8	27±1.2	3±0.1	11±0.7	4±0.2	21±1.0
Селезенка	40±1.9	29±1.2	3±0.1	2±0.1	2±0.1	4±0.3
Стенка кишечника	31±1.1	23±1.4	—	3±0.3	2±0.2	3±0.1
Печень	15±0.6	10±0.6	—	—	2±0.3	3±0.1

плотвы и карпа соответственно. Удельная активность печени карпа, щуки и плотвы была меньше таковой почек и селезенки. Возможно, печень рыб менее богата клетками, участвующими в поглощении чужеродных тел, чем почки и селезенка. Это хорошо согласуется с данными наших исследований по определению частоты встречаемости иммунокомпетентных клеток в мазках-отпечатках печени карпов (Микряков, Балабанова, 1979). На 0.1 мм<sup>2</sup> мазка-отпечатка в печени карпов в среднем приходится 15 клеток (табл. 16). Это меньше, чем в почках, селезенке и стенке кишечника. В печени иммунокомпетентные клетки были менее разнообразны и представлены малыми лимфоцитами, ретикулярными клетками и гранулоцитами. Низкое содержание <sup>14</sup>C бактерий в 1 г печени, по-видимому, обусловлено тем, что купферовские клетки, или звездчатые клетки, по сравнению с таковыми у теплокровных, менее активны в поглощении чужеродных тел (Аничков, 1930; Румянцев, 1939; Kraft, 1925). По всей вероятности, аналогичное явление имеет место при бактериальном инфицировании организма рыб. Сравнивая результаты наших исследований с литературными данными, полученными на теплокровных животных (Иванов и др., 1954; Учитель, 1957; Гурвич, Шумакова, 1963), мы установили, что поглотительная активность печени рыб в переводе на 1 г массы ниже, чем у кроликов и крыс.

Несмотря на то, что в тканях печени у исследуемых рыб на единицу массы задерживается гораздо меньшее количество <sup>14</sup>C бактерий по сравнению с другими органами, в данном органе у ряда видов рыб концентрируется более половины введенного в организм количества ме-



около 60% учтенного радиоактивного углерода бактерий, у леща — 40%, окуня — 35%, карпа — 25%, щуки — 20% и плотвы — 16% (табл. 15). Если сравнить нейтрализующую емкость печени карасей, леща и окуня с таковой других органов, то она занимает одно из ведущих мест в поддержании постоянства внутренней среды организма. Хотя печень рыб не участвует в синтезе антител (Микряков и др., 1974), тем не менее, она выполняет важную роль в утилизации продуктов распада бактерий и иммунокомпетентных клеток, участвующих в разрушении и транспорте микробов и их дериватов. Об этом свидетельствуют не только данные прямого учета  $^{14}\text{C}$  бактерий в гомогенатах печени, но и данные автордиографических исследований (рис. 18). Большая часть радиоактивных меток в мазках-отпечатка обнаружена над нейтрофилами, эритроцитами и их обломками. Вполне возможно, что  $^{14}\text{C}$  бактерий в печень поступает с клетками крови, подлежащими разрушению. Печень, как известно, у животных и человека участвует не только в нейтрализации токсических веществ, в синтезе белков, гликогена, жировом обмене, но и в реутилизации эритроцитов и «старых» лейкоцитов (Коробков и др., 1980). В результате распада эритроцитов синтезируются желчные кислоты и пигмент участвующие в формировании желчи. По-видимому, этим и объясняется относительно высокая радиоактивность желчи у исследуемых рыб. Вероятно, в процессе метаболизма  $^{14}\text{C}$  бактерий в печени включается в синтез желчных кислот и принимает участие в энтеральном пищеварении, часть их поступает обратно в ток крови и участвует в эритропоэзе, возможно и лейкопоэзе. Не исключено, что незначительная часть желчных кислот в виде стеркобелина вместе с продуктами распада пищи выводится наружу.

Нельзя не обратить внимания на адсорбционную способность стенок кишечника рыб. Содержание углерода бактерий в тканях стенки кишечника карася и щуки было сравнительно высоким (табл. 14, 15). У остальных видов рыб концентрации  $^{14}\text{C}$  бактерий в стенках кишечника была выше, чем в 1 г мышц и мозга, но несколько меньше, чем в почках, селезенке и печени. При определении общего количества  $^{14}\text{C}$  бактерий, задержавшегося во всем органе, в стенках кишечника щуки обнаружено около 38, у леща и окуня по 17, плотвы и карася по 11, а у карпа — 6,4%. Различия, вероятно, связаны с неодн-

та и неравной концентрацией клеток рыхлой соединительной ткани, гистиоцитов и других клеток, участвующих в поглощении чужеродных тел (Халилов, 1969; Ellis, Parkhouse, 1975). Концентрация меченого углерода бактерий в стенках кишечника, возможно, связана также с элиминацией его через кишечный тракт, поскольку радиоактивный углерод обнаруживали в содержимом кишечника карпа спустя 20 сут и более (Гончаров и др., 1966). Углерод бактерий из стенок кишечника, печени, почки и селезенки выводятся не полностью и задерживается более чем на 2 года (Микряков, Флеров, 1970).

В мышцах исследуемых рыб концентрация  $^{14}\text{C}$  бактерий была самой низкой — 0.03—1% от введенного на 1 г ткани. Небольшая удельная активность мышц обусловлена незначительным числом гистиоцитов в межклеточной соединительной ткани (Заварзин, 1945). Несмотря на это, мышцы, составляющие около 40% массы тела, удерживают значительную часть введенного радиоактивного углерода бактерий (табл. 15). У плотвы и карпа в мышцах задерживается  $^{14}\text{C}$  бактерий значительно больше, чем в тканях других органов.

Удельная радиоактивность тканей мозга была больше, чем таковая мышц, но общее количество  $^{14}\text{C}$  микробов меньше в сравнении с другими органами. Это можно объяснить небольшой массой данного органа, низкой концентрацией клеток ретикуло-эндотелиальной системы (Заварзин, 1945) и наличием гемато-энцефалического барьера.

Кровь, как известно, выполняет разнообразные функции, в т. ч. и транспортную. Концентрация радиоактивного углерода бактерий в крови у всех исследуемых рыб была одинаковой (табл. 15). Полученные данные позволяют предположить, что поглотительная емкость 1 г крови не зависит от видовых особенностей рыб, но имеются существенные межвидовые различия в количестве поглощенного  $^{14}\text{C}$  бактерий всей кровью. В кровяном русле плотвы задерживается в среднем 16%, карпа — 15, леща и щуки — 12.5, окуня — 9, карасей — 3% углерода бактерий, что связано с неодинаковым объемом крови исследуемых рыб. Проведенный дифференциальный учет особенностей распределения  $^{14}\text{C}$  бактерий в составе сыворотки крови и форменных элементах показал их различную поглотительную активность. Концентрация  $^{14}\text{C}$  бактерий в клетках крови была более чем в

( $1.89\% \pm 0.18\%$ ). Это свидетельствует о том, что меченый углерод бактерий из брюшной полости поступает в кровь после переваривания их клетками фагоцитарной системы; форменные элементы крови мало или вообще не участвуют в фагоцитозе бактерий и, видимо, не играют существенной роли в транспорте радиоактивного углерода бактерий.

Присутствие  $^{14}\text{C}$  бактерий в составе слизи, особенно в первые несколько суток после введения меченных микробов, свидетельствует об элиминации их через кожный покров в составе метаболитов, образующихся в результате их парентерального пищеварения (Микряков, 1965; Гончаров и др., 1966).

**Распределение  $^{14}\text{C}$  патогенных и непатогенных бактерий в организме рыб.** Разные виды бактерий в организме рыб распадаются с неодинаковой интенсивностью. Патогенные микробы разрушаются медленнее, чем автотрофные, что, по-видимому, связано с различной поглотительной активностью тканей и органов, участвующих в катаболизме бактерий.

Нами проведено определение особенностей распределения возбудителей аэромоноза *Aeromonas punctata* и водоокисляющих микробов *Hydrogenomonas facilis* в организме карпов (табл. 17).

Таблица 17

Содержание  $^{14}\text{C}$  бактерий разных видов в тканях и органах карпа через сутки после введения, % от введенного на 1 г ткани

Название ткани, органа	<i>Aeromonas punctata</i>	<i>Hydrogenomonas facilis</i>
Кровь	$1.16 \pm 0.15$	$0.90 \pm 0.08$
Сыворотка	$2.32 \pm 0.11$	$1.89 \pm 0.18$
Сгусток	$0.63 \pm 0.10$	$0.41 \pm 0.10$
Печень	$0.99 \pm 0.14$	$1.00 \pm 0.10$
Желчь	$0.77 \pm 0.27$	$1.73 \pm 0.28$
Почки	$3.40 \pm 0.37$	$5.07 \pm 1.40$
Селезенка	$18.22 \pm 1.80$	$2.58 \pm 0.30$
Стенка кишечника	$0.55 \pm 0.12$	$0.72 \pm 0.14$
Мышцы	$0.24 \pm 0.05$	$0.16 \pm 0.02$
Мозг	$0.36 \pm 0.03$	$0.44 \pm 0.06$

Примечание. В каждом варианте опыта использовали по 10 экз. рыб

Существенных различий в распределении радиоактивного углерода *Aeromonas punctata* и *Hydrogenomonas facilis* в организме рыб, за исключением селезенки, не

обнаружено почти в 6 раз больше, чем  $^{14}\text{C}$  водородокисляющих бактерий. Вероятно, такая высокая концентрация в селезенке рыб, как у млекопитающих (Высокович, 1954; Гинзбург—Калинина, 1961; Ундрицов, 1962) объясняется избирательной поглотительной активностью тканей данного органа по отношению к различным видам бактерий. Между поглотительной активностью тканей и видовыми особенностями микробов существует определенная зависимость и специфичность. В основе этих явлений, по-видимому, лежит фактор тропизма или антигенного сродства бактерий к определенным тканям.

**Анаболизм бактериального антигена.** Особенности распределения и длительность пребывания углерода бактерий в тканях рыб указывают на его участие в конструкторском обмене и синтезе антител. Это подтверждается результатами биохимического и радиометрического исследований различных компонентов тканей рыб. При осаждении белков сыворотки крови, печени, почек, селезенки и мышц 10%-ным раствором трихлоруксусной кислоты основная часть метки выявлена в осадке ( $0.51 \pm \pm 0.08$ ) % на 1 г ткани, а в надосадочной жидкости только ( $0.08 \pm 0.01$ ) % от введенного количества радиоактивности. Гликоген и липиды сыворотки крови и гомогенатов тканей содержали незначительные величины радиоактивности, близкие к фону. Дифференцированный анализ распределения радиоактивного углерода на электрофореграмме сывороточных белков позволил установить метку во всех фракциях. Радиоактивность во фракции альбумина была равна 34.2% (от всей определенной радиоактивности сыворотки крови), во фракции  $\alpha$ -глобулинов — 19.5%, во фракции  $\beta$ -глобулинов — 24.4% и во фракции  $\gamma$ -глобулинов — 22%. Наибольшая радиоактивность, выявленная во фракции альбуминов, связана, по-видимому, с большим удельным весом этих белков.

Исходя из вышеизложенного следует, что  $^{14}\text{C}$  микробов в основном включается в белковый обмен, лишь незначительная часть — в углеводный и липидный.

### **Включение углерода бактерий в синтез антител**

Исследованиями особенностей распределения меченых по  $^{14}\text{C}$  бактерий показано, что  $^{14}\text{C}$  микробов выявлен во всех белковых фракциях сыворотки крови, в т. ч. в глобулинах, в состав которых входят и антитела. Это позволяет считать, что углерод антигена в процессе мета-

и антител. Косвенным подтверждением этому является и то, что  $^{14}\text{C}$  бактерии нами обнаружены в цитоплазме антителосинтезирующих структур — лимфо-, плазмобластах и плазматических клетках карпов и карасей (Микряков, Балабанова, 1979).

Чтобы проверить это предположение, мы определяли метки в антителах карпов, иммунизированных мечеными по  $^{14}\text{C}$  бактериями *Aeromonas punctata* (Микряков, Балабанова, 1984).

Материалом для исследования послужила сыворотка крови 18 карпов, полученная через различные промежутки времени (1, 3, 5, 10, 20, 30 сут) после внутрибрюшинного введения меченых бактерий в дозе 1 млрд. тел с радиоактивностью 200 тыс. имп./мин. Бактерий метили с помощью  $^{14}\text{C}$  глюкозы. Антитела для определения радиоактивности из сыворотки осаждали с помощью немеченых микробов в реакции агглютинации. Агглютинат отделяли через сутки путем 3-кратного центрифугирования физиологическим раствором. Агглютинат, надосадочную жидкость, а также сыворотку в количестве 0.5 мл наносили на бумажные фильтры площадью 1 см<sup>2</sup>. Радиоактивность исследуемых образцов определяли методом макроавторадиографии и под торцовым счетчиком Гейгера—Мюллера.

Количество  $^{14}\text{C}$ -антигена, обнаруженное в составе агглютината, зависит от времени взятия пробы после иммунизации рыб (табл. 18,19).

Таблица 18

Содержание  $^{14}\text{C}$  бактерий в сыворотке крови в агглютинатах, имп./мин

Время взятия пробы, сут	Радиоактивность, имп./мин на 100 мг		РА агглютининов, % от РА сыворотки
	сыворотки	агглютината	
1	107	24	22.9
3	83	27	32.5
5	89	50	56.1
10	65	34	52.3
20	68	22	32.3
30	70	13	18.1

Параллелизма в динамике изменения удельной радиоактивности в сыворотке крови и агглютинидах при обоих способах определения содержания  $^{14}\text{C}$  бактерий не установлено. Максимальные величины оптической плотности радиоавтографов сыворотки, как и ее удельной радио-

через 5 суток (табл. 18, 19). В последующем исследуемые величины снижались. Очевидно, более медленное увеличение РА агглютининов, по сравнению с таковыми сыворотки крови, вызвано постепенным образованием антител и поступлением их в сыворотку крови. Это хорошо согласуется с данными исследований клеточной реакции в РЛТ почек и закономерностей синтеза антител у рыб (Микряков, Балабанова, 1979).

Таблица 19

**Оптическая плотность радиоавтографов сыворотки крови и агглютининов**

Время взятия пробы, сут	Оптическая плотность радиоавтографов, отн. ед.		РА агглютининов, % от РА сыворотки
	сыворотки	агглютининов	
1	64.9	6.1	9.4
3	27.5	4.9	17.8
5	23.6	11.0	46.6
10	21.5	9.3	43.2
20	21.0	4.7	22.4
30	20.0	2.8	14.0

Данные этих исследований позволяют считать, что углерод бактерий, внесенный в организм рыб в составе чужеродных тел, после метаболизма антигенразрушающими структурами включается в структуру антител, выполняющих функцию нейтрализации и распознавания «чужого».

**Влияние некоторых факторов внешней среды на скорость метаболизма бактериального антигена в организме рыб**

Проведено исследование влияния температуры, блокады РЭС тушью и иммунизации на процессы разрушения и распределения  $^{14}\text{C}$  микробов в организме рыб.

**Особенности метаболизма бактерий при разной температуре.** Температура воды является одним из важнейших факторов, влияющих на ход биологических процессов в водоемах и на активность функционирования всех живых существ. Рыбы, будучи пойкилотермными животными, находятся в большей зависимости от температуры окружающей среды, чем гомойотермные животные. В соответствии с изменением температуры воды у рыб меняется интенсивность всех физиологических функций, в том числе антителообразовательной. При содержании рыб в низких для их оптимального роста и

ма замедляются и, наоборот. Аналогичный эффект оказывают низкие и высокие температуры на интенсивность антителогенеза (Гончаров, 1962; Микряков, 1964а; Лукьяненко и др., 1967; Nybelyn, 1934, 1968; Ambrosius, Schaker, 1964; Ambrosius, 1967; Avtalion, 1969, 1981; Collins et al., 1976; Fijan et al., 1977; Anderson et al., 1979; Nakai, Muroga, 1979). При низких температурных условиях процессы синтеза антител замедляются, а при высоких — повышаются. Поскольку антитела являются продуктом жизнедеятельности клеток лимфоидно-макрофагальной системы, то антителообразование к бактериям иммунокомпетентными клетками начинается после перевода их макрофагами в иммуногенную форму. Отсюда, естественно, возникает вопрос о влиянии температуры воды на функцию антигенразрушающих структур. Знание особенностей метаболизма бактерий при разных температурных условиях позволило бы глубже понять функционирование антигенразрушающих структур и имело бы определенное значение при разработке вопросов управления процессами иммуногенеза путем изменения температуры воды.

Опыты по влиянию характера действия разных температур на процессы метаболизма бактерий в организме рыб ставили на 68 карасях (в возрасте 2+) при температуре 8—10° и 18—20°С. Инокуляцию бактерий в организме рыб осуществляли путем внутрибрюшинных инъекций в дозе 0.2 мл. соответствующей 2 млрд. бактериальных тел и  $16 \times 10^5$  имп./мин. В качестве бактерий использовали меченые  $^{14}\text{C}$  водородокисляющие бактерии *Hydrogenomonas facilis*. Параллельно с целью выявления зависимости функциональной активности защитных реакций иммунологической системы карасей от уровня происходящих в организме метаболических реакций, учитывали общее количество выделенного  $\text{CO}_2$  опытными (температура воды 8—10°С) и контрольными (температура воды 18—20°С) рыбами при дыхании.

Низкие температуры угнетают способность тканей рыб поглощать  $^{14}\text{C}$  бактерий (табл. 20). Количество  $^{14}\text{C}$  бактерий в тканях контрольных рыб через 24 ч было в 2—3 раза больше, чем в тканях рыб, содержащихся при температуре 8—10°С. На 3-и сут эта разница несколько уменьшилась, за исключением мышц. В мышцах контрольных рыб  $^{14}\text{C}$  бактерий было в 4 раза больше, чем опытных. На 5-е сутки количество радиоактивного углеро-

Содержание  $^{14}\text{C}$  бактерий *Hydrogenomonas facilis* в тканях карасей при различной температуре, % от введенного на 1 г ткани

Время инкубации, ч	Температура, °C	Кровь	Печень	Желчь	Почки	Селезенка	Стенка кишечника	Мышцы	Мозг
1	18-20	0.12 ± 0.004	1.25 ± 0.08	—	0.39 ± 0.05	0.54 ± 0.14	—	0.04 ± 0.006	0.07 ± 0.01
	8-10	0.10 ± 0.004	0.79 ± 0.19	—	0.29 ± 0.05	0.91 ± 0.08	—	0.04 ± 0.004	0.06 ± 0.01
4	18-20	1.11 ± 0.13	3.45 ± 0.30	1.82 ± 0.28	2.09 ± 0.20	2.80 ± 0.32	1.91 ± 0.16	0.11 ± 0.01	0.31 ± 0.05
	8-10	0.56 ± 0.07	1.26 ± 0.03	0.56 ± 0.12	1.45 ± 0.12	1.68 ± 0.28	1.58 ± 0.07	0.06 ± 0.007	0.15 ± 0.02
8	18-20	0.84 ± 0.06	5.82 ± 0.55	3.03 ± 0.37	3.26 ± 0.19	4.46 ± 0.77	2.59 ± 0.37	0.23 ± 0.03	0.56 ± 0.07
	8-10	1.36 ± 0.17	3.69 ± 0.42	1.69 ± 0.26	1.93 ± 0.19	2.19 ± 0.32	2.13 ± 0.40	0.08 ± 0.01	0.26 ± 0.05
10	18-20	0.63 ± 0.08	2.83 ± 0.26	2.82 ± 0.27	2.66 ± 0.18	2.79 ± 0.37	3.87 ± 0.25	0.18 ± 0.01	0.74 ± 0.04
	8-10	0.92 ± 0.05	4.82 ± 0.31	2.76 ± 0.29	2.50 ± 0.36	1.71 ± 0.21	2.23 ± 0.38	0.10 ± 0.01	0.41 ± 0.05

Примечание. В каждом варианте опыта использовали по 10 экз. рыб.



18—20°C уменьшилось. Очевидно, это связано с более интенсивным распадом бактерий в организме и выведением продуктов разложения из организма (рис. 19). Относительное количество  $^{14}\text{C}$  бактерий в тканях опытных рыб на 5-е сутки, по сравнению с контрольными, наоборот, увеличивается. Например, в 1 мг крови, печени и почек активность тканей через сутки равнялась 14.3, 48 и 23 имп./мин, а через 5 сут она доходила соответственно до 34, 130 и 65 имп./мин. Несмотря на обнаруженную разницу поступления  $^{14}\text{C}$  бактерий в ткани контрольных и опытных рыб, способность тканей и органов (за исключением крови) поглощать радиоактивный углерод у рыб, содержащихся при температуре 8—10°C в течение

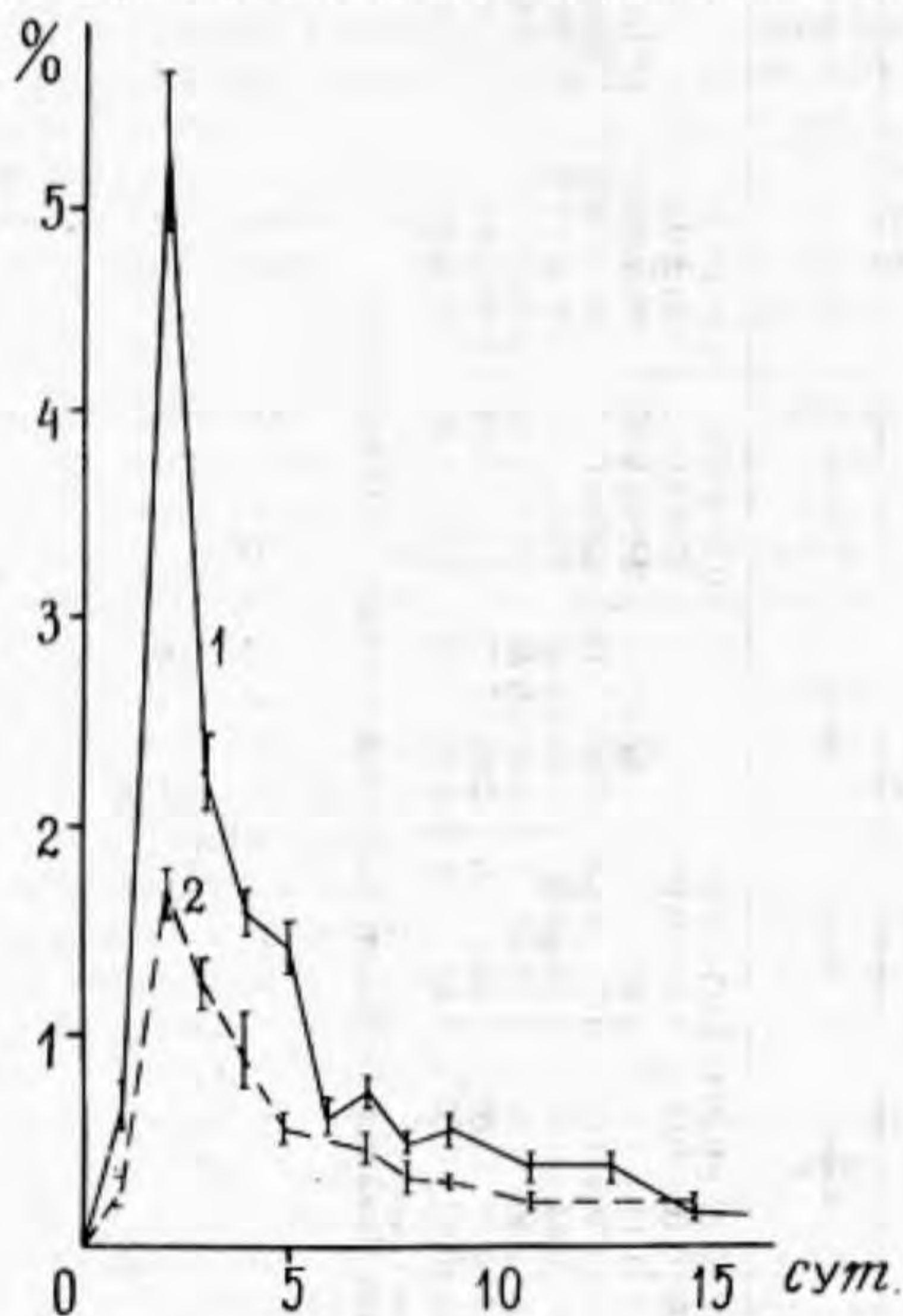


Рис. 19. Выделение продуктов распада бактерий *Hydrogenomonas facilis* у карасей при температуре 18—20°C (1) и 8—10°C (2).

всего опыта, оставалась ниже, чем у рыб контрольной группы.

Низкая температура воды, вызывая снижение поглотительной активности тканей рыб, соответственно угнетает процесс разрушения и выведения продуктов распада микробов из организма. Это хорошо видно на кривых, характеризующих динамику выведения  $^{14}\text{C}$  бактерий из организма (рис. 19). Общее количество  $^{14}\text{C}$  бактерий, выделенное в составе углекислоты за 15 сут карасями, содержащимися в холодной воде, в среднем равнялось 7, а у контрольных — 15.5% от введенных.

Сходные данные по влиянию температуры на разложение антигена иммунокомпетентными клетками пронефроса гольца (*Salmo alpinus* L.) *in vitro* получили Данневиг и Берг (Dannevig, Berg, 1985). В пределах 0—20°C, ими выявлена линейная зависимость в интенсивности разрушения сывороточного альбумина человека клетками пронефроса.

При сопоставлении выделенного меченого углерода в составе выдыхаемой углекислоты (табл. 21) видно, что процесс разрушения и элиминации продуктов распада бактерий из организма зависит от уровня общего обмена. У рыб, находящихся при низкой температуре, интенсивность дыхания снижается более чем в 3 раза.

Таблица 21

Интенсивность дыхания рыб при разной температуре, мг  $\text{CO}_2$

Температура воды, °C	Время анализа, сут				
	1	2	3	4	5
8—10	66.5±3.2	57.9±11.6	72.3±4.5	71.6±6.9	67.0±8.2
18—20	190±25	200±22	195±26	210±20	217±29

Таким образом, температура воды существенно влияет на функционирование иммунологической системы карасей. Низкая температура воды, снижая уровень обменных реакций в организме, угнетает функциональную активность антигенразрушающих структур, вследствие чего процессы поглощения тканями и органами бактерий и последующее их разрушение и выведение продуктов распада бактериальных тел из организма рыб замедляются.

Влияние блокады ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС) рыб тушью на процессы поглощения и выведения продуктов распада бактерий из организма. Независимо

активностью на единицу массы обладали ткани и органы, богатые клетками РЭС. Можно предположить, что клетки РЭС в организме животных обладают определенной «емкостью» по отношению к чужеродному веществу и могут поглотить за один раз лишь определенное количество органических и минеральных частичек, чужеродных для организма. Емкость этих клеток не беспредельна и в случае блокады РЭС одним веществом снижается функциональная активность этой системы по отношению к другому веществу или инородному телу. Чтобы понять, каким образом влияет функциональное состояние РЭС на процессы нейтрализации и разрушения бактериальных тел, нами проведено исследование влияния блокады лимфоидно-макрофагальной системы тушью.

В опытах использовали 48 карасей в возрасте 2+ и бактерии *Hydrogenomonas facilis*, меченые по  $^{14}\text{C}$ .

У опытных рыб после блокады РЭС тушью накопление радиоактивного углерода микробов происходит медленнее, чем у контрольных, что особенно заметно в первые сутки после инокуляции меченых бактерий (рис. 20).

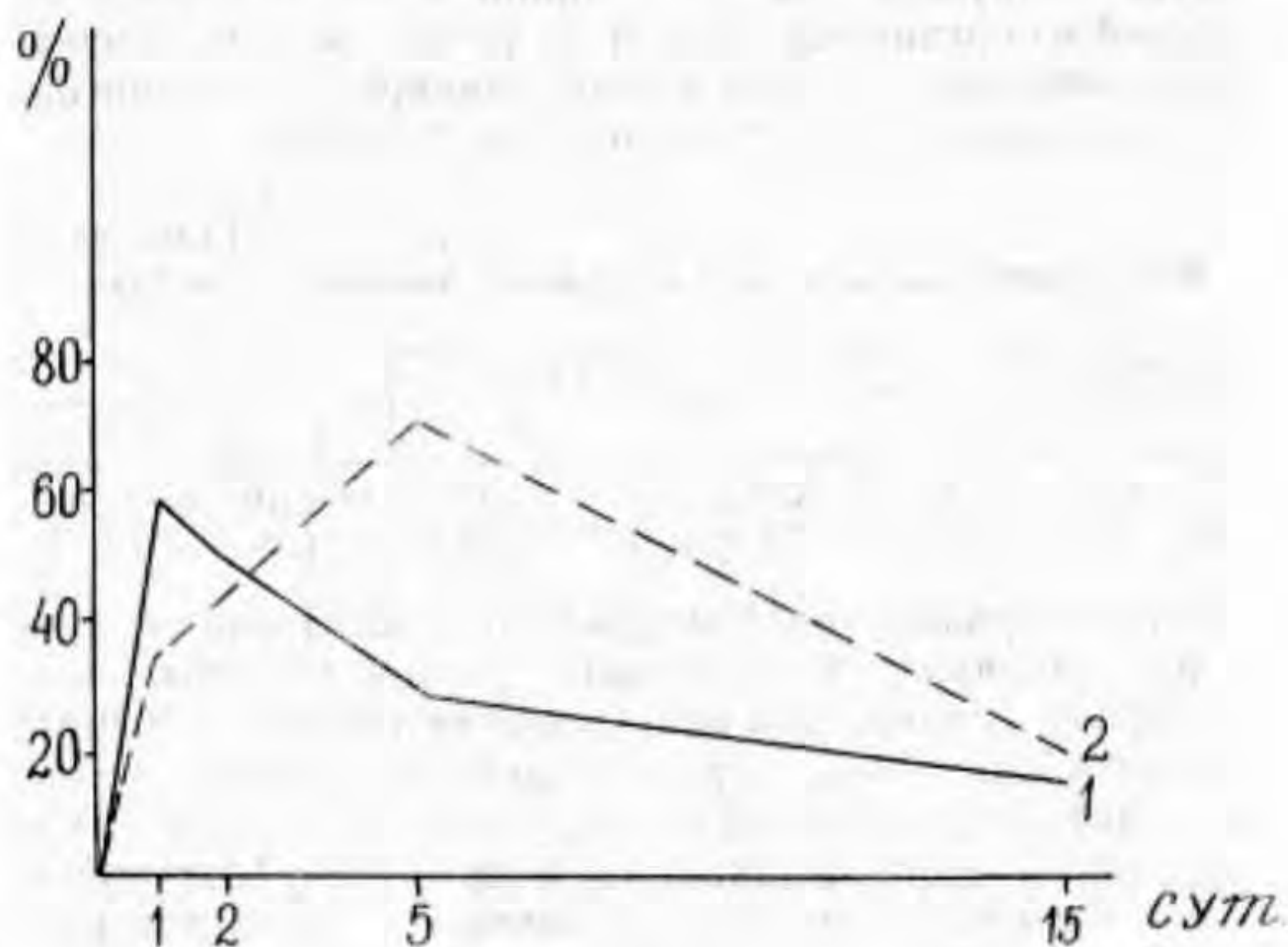


Рис. 20. Влияние туши на суммарное содержание  $^{14}\text{C}$  *Hydrogenomonas facilis* в печени, почках, селезенке и стенке кишечника у контрольных (1) и опытных (2) рыб.

В тканях внутренних органов рыб (печени, почках, селезенке и стенке кишечника) через сутки обнаружено 35%, у контрольных — 61% от введенного количества  $^{14}\text{C}$  бактерий. К концу 5 суток у контрольных рыб содержание  $^{14}\text{C}$  бактерий падает до 30%, а у опытных, наоборот, нарастает до 75%. Введение туши отражается не только на процессах поступления радиоактивного углерода бактериями в организм рыб, но и на интенсивности разрушения микроорганизмов и выведения продуктов их распада из организма. На 2-е сут количество  $^{14}\text{C}$  бактерий у конт-

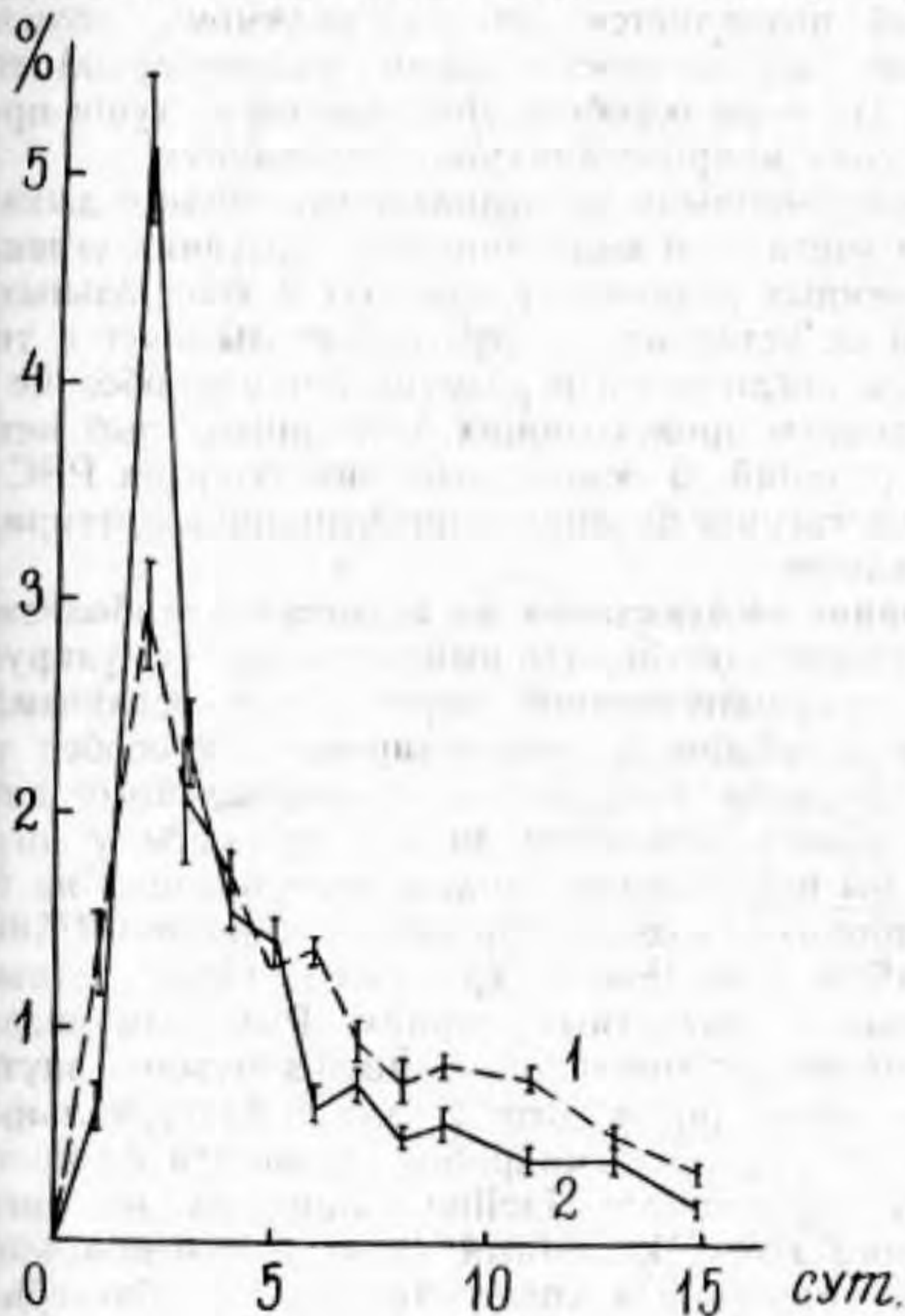


Рис. 21. Влияние туши на выделение продуктов распада *Hydrogenomonas facilis* у карасей при дыхании.

1 — контроль, 2 — опыт. Обозначения осей те же, что и на рис. 15.

рольных карасей при дыхании выделялось почти в 2 ра-

(рис. 21). В дальнейшем интенсивность выведения продуктов распада бактерий у контрольных снижалась, а у опытных, наоборот, нарастала. Несмотря на это, общее количество  $^{14}\text{C}$  бактерий, учтенное в составе выделенной при дыхании углекислоты за 15 сут у опытных и контрольных рыб, равнялось 16 и 15.5% от биомассы введенного в организм меченого углерода бактерий.

Таким образом, тушь оказывает временное блокирующее действие на функцию РЭС, вследствие чего поглотительная функция тканей и последующее разрушение бактерий подавляется. Это, по-видимому, обусловлено степенью загруженности клеток фагоцитарной системы тушью. По мере освобождения клеток от туши процессы разрушения микроорганизмов усиливаются.

Одновременными исследованиями общего дыхания по данным учета всей выделенной при дыхании углекислоты существенных различий у опытных и контрольных групп карасей не установлено. Это свидетельствует о том, что процессы поглощения и разрушения микробов не связаны с уровнем происходящих в организме рыб метаболических реакций. В основе действия туши на РЭС лежит непосредственное блокирование функций антигенразрушающих клеток.

**Влияние иммунизации на процессы катаболизма бактерий.** Общеизвестно, что иммунизация стимулирует процессы иммунологической перестройки организма рыб. Вполне возможно, у иммунизированных особей ускоряются процессы разрушения бактериального антигена. Чтобы понять, меняются ли эти процессы у иммунных рыб — мы исследовали влияние иммунизации на процессы катаболизма водородокисляющих бактерий (Микряков, 1965, 1966; Гончаров и др., 1966). Опыты ставили на иммунных и интактных карпах. Рыб иммунизировали немечеными *Hydrogenomonas facilis* путем внутрибрюшинных инъекций в дозе 2 млрд. бактериальных тел. Процесс разрушения микробов оценивали по количеству  $^{14}\text{C}$  *Hydrogenomonas facilis* вышедших из организма рыб через кожу, кишечный тракт и мочеполовые пути. Меченые бактерии в количестве 2 млрд. бактериальных тел (соответствующей 150—200 тыс. имп./мин) иммунным рыбам вводили внутрибрюшинно через 30 сут после первой инъекции немеченных микробов. Радиоактивность учитывали методом автордиографии и прямого счета.

Выяснено, что иммунизация стимулирует функциональ-

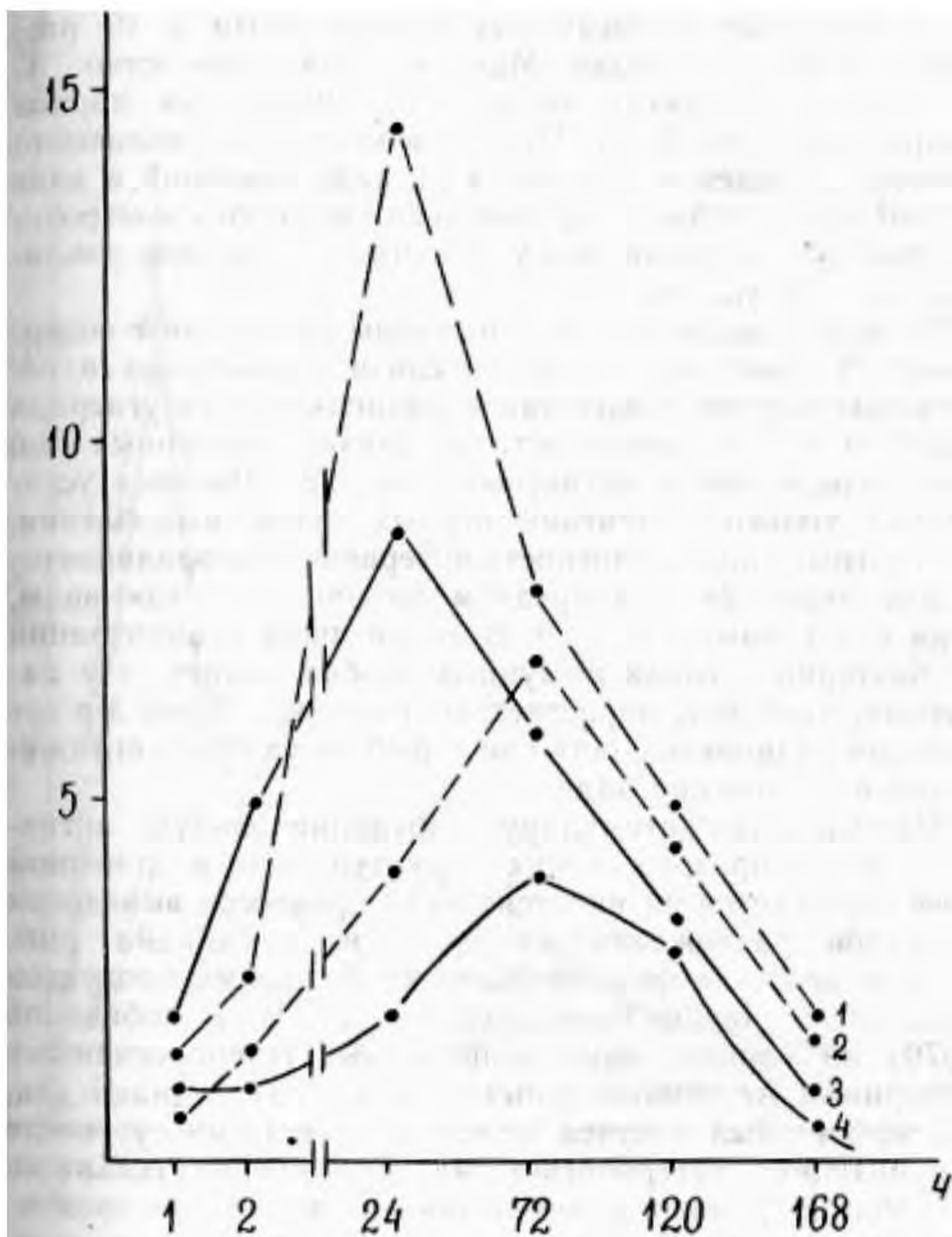


Рис. 22. Радиоактивность слизи (1, 2) и продуктов экскреции (3, 4) иммунных (1, 3) и неиммунных (2, 4) карпов.  
По оси ординат — оптическая плотность радиоавтографов, усл. ед.

вне чего процессы разложения и выведения продуктов распада микробов у иммунных карпов усиливаются (рис. 22). Содержание радиоактивного углерода микробов в продуктах экскреции у иммунных карпов нарастает быстрее, чем у интактных. Это различие особенно заметно в течение первых суток наблюдения. Содержание радиоактивного углерода в 1 мг сухого остатка

опыта нарастает у иммунных карпов почти в 10 раз, у интактных — в 4 раза. Максимальное количество  $^{14}\text{C}$  бактерий в продуктах экскреции у интактных карпов обнаружено через 3 сут. При этом кратность увеличения процесса выведения продуктов распада бактерий в виде неидентифицированных органических веществ у контрольных рыб была меньше, чем у иммунных, в среднем равнялась 6.5—7.5 усл. ед.

Аналогичные результаты получены при анализе содержания  $^{14}\text{C}$  бактерий в составе слизи у иммунных и неиммунных карпов. Содержание радиоактивного углерода микробов в 1 мг сухого остатка слизи у иммунных рыб было больше, чем у интактных (рис. 22). Разница установлена только в течение первых суток наблюдения. У интактных карпов плотность почернения автордиоавтографов через 24 ч в среднем равнялась 2 единицам, тогда как у иммунных — 9. В дальнейшем концентрация  $^{14}\text{C}$  бактерий в слизи иммунных особей падает, а у интактных, наоборот, нарастает до 4 единиц. Через 3-е сут удельная радиоактивность слизи рыб обеих групп сглаживается и постепенно падает.

Иммунизация стимулирует функциональную активность антигенразрушающих структур, что в конечном итоге отражается на интенсивности процессов выведения продуктов разложения микробов из организма рыб. Сходное действие по выведению из организма продуктов распада *N. facilis* было получено Л. В. Балабановой (1979) на карпах, иммунизированных гетерологичными бактериями *Aeromonas punctata* (рис. 23). Однако данный эффект был получен между 2-ми и 10-ми сут после иммунизации гетерологичными, грамотрицательными микробами. Разница в интенсивности выведения продуктов распада *Hydrogenomonas facilis* в составе углекислоты обнаружена в течение первых суток, а в виде неидентифицированных органических веществ — между 5-ми и 19-ми сут. В дальнейшем у опытных и интактных групп рыб интенсивность выведения продуктов распада сглаживается. Тем не менее, общее количество углерода бактерий, выделенного за 15 сут из организма опытных рыб, было больше (24%), чем у контрольных (18.6%). В случае выведения дрожжевых клеток из рода *Saccharomyces*, ингибирующих активность обменных процессов, интенсивность разрушения *N. facilis* и выведения продуктов их распада из организма замедляется

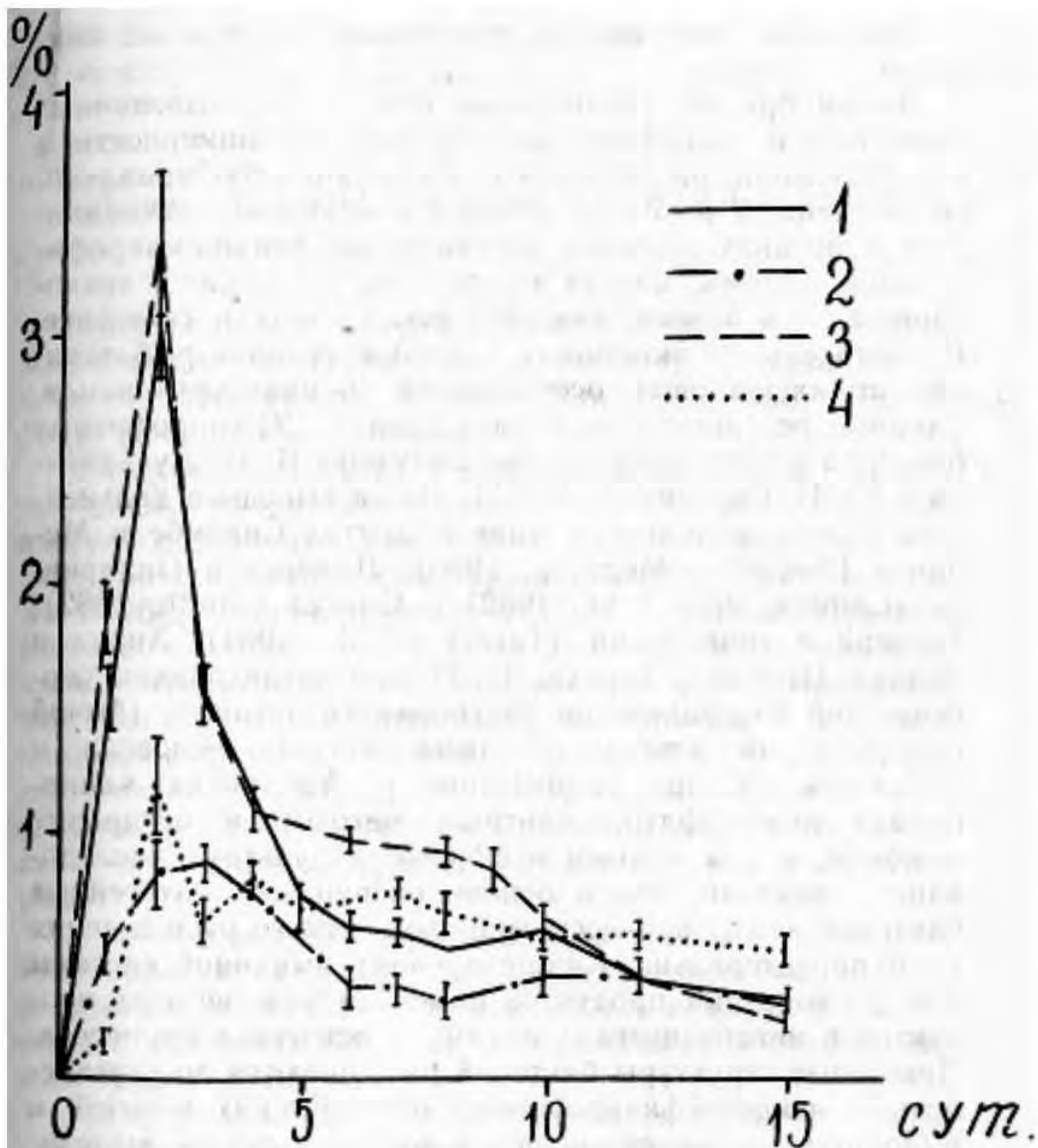


Рис. 23. Влияние предварительного введения *Aeromonas punctata* на выделение продуктов распада меченых *Hydrogenomonas facilis* у контрольных (1, 2) и опытных (3, 4) рыб.

1, 3 — выделение  $^{14}\text{C}$  бактерий в составе углекислоты, 2, 4 — то же органических веществ. Обозначения осей те же, что и на рис. 15.

Выявленный эффект стимулирующего действия грам-отрицательных микроорганизмов следует считать тахифилаксическим, подобно тому, который встречается среди высших позвоночных животных (Берман, Славская, 1970; Земсков и др., 1977). Этот эффект является неспецифическим и может быть получен при введении как гра-



в виде липополисахаридов, полученных из этих же бактерий.

Таким образом, установлены общие для позвоночных животных и специфические для рыб закономерности в распределении, разрушении и элиминации бактериального антигена. У рыб  $^{14}\text{C}$  бактерий в основном задерживается в органах, богатых клетками лимфоидно-макрофагальной системы, почках и селезенке, тогда как у теплокровных — в печени, лимфатических узлах и селезенке. Поглощительная активность тканей и органов рыб зависит от их видовых особенностей и микроорганизмов. Сходные результаты по распределению  $^{14}\text{C}$  сапрофитных бактерий в организме плотвы получены В. И. Лукьяненко и Ю. И. Сорокиным (1965). Наши выводы в дальнейшем получили подтверждение в опытах Сикомбе и Менинга (Sekombe, Menning, 1980), Ламерса и Пиларчика (Lamers, Pilarczyk, 1982) и Смисса (Smith, 1982), Татнера с соавторами (Tatner et al., 1984), Хириз и Запата (Herraez, Zapata, 1987) при исследовании особенностей распределения растворимого антигена (бычий сывороточный альбумин, гамма-глобулин человека и О-антиген (*Vibrio anguillarum* и *Aeromonas salmonicida*) иммунофлуоресцентным методом в организме камбалы, карпа, карася и форели. Результаты исследования показали, что в основе разрушения патогенных бактерий лежат процессы гидрологического расщепления (или парентерального пищеварения) иммунной системы рыб до конечных продуктов обмена и участие этих продуктов в метаболических и иммунологических процессах. Некоторые структуры бактерий разрушаются до углекислоты и неидентифицированных органических веществ и выводятся из организма через жабры и другие выделительные системы, а другая часть  $^{14}\text{C}$  бактерий задерживается в тканях рыб более 2 лет и включается в белковый обмен. Скорость разрушения бактерий и выведение продуктов их распада зависят от функционального состояния РЭС и уровня активности метаболических процессов, а также патогенных свойств микробов и видовых особенностей рыб.

Данные по распределению меченых бактерий и элиминации продуктов их распада из организма рыб не согласуются с выводами Б. Т. Аветикяна (1959) о быстром выбросе из организма чужеродных тел в неизменном виде. Напротив, парентерально введенный антиген по-

процессы разрушения у позвоночных животных в процессе их эволюции существенно не изменились.

## Глава IV. ОБРАЗОВАНИЕ АНТИТЕЛ У РЫБ

Антитела — это белки животного происхождения, принадлежащие к категории сывороточных глобулинов, имеющих гликопротеидную природу (Зильбер, 1958; Незлин, 1972; Кяйваряйнен, Незлин, 1978).

Как указывает А. И. Кяйваряйнен (1978), все гликопротеиды, обладающие функцией антител и называемые иммуноглобулинами, имеют близкие антигенные и химические свойства, одинаковые принципы построения молекулы и общее филогенетическое происхождение. Принято считать, что образование антител является частным случаем синтеза белка и подчиняется тем же закономерностям, которые определяют синтез белка вообще в живой природе (Здродовский, 1969; Незлин, 1972). Разница заключается лишь в том, что они комплементарны к антигену, вызывающему их образование. Комплементарность антител к антигену обусловлена наличием активных центров.

Антитела в организме животных в большинстве случаев образуются в ответ на введение антигена, либо в результате перенесенной инфекции или инвазии в естественных условиях, либо при аутоиммунных заболеваниях животных и человека.

По происхождению антитела делятся на естественные (или нормальные) и приобретенные. Хотя причина, вызвавшая образование естественных антител в организме животных, в том числе и рыб, для многих случаев остается неразгаданной, тем не менее, в организме позвоночных всегда присутствуют нормальные иммуноглобулины, комплементарные ко многим чужеродным телам: эритроцитам, паразитам животного и растительного происхождения и т. д. Более подробные сведения о естественных антителах у рыб можно найти в монографиях В. И. Лукьяненко (1971, 1989). В. И. Лукьяненко впервые провел детальное исследование нормальных антител к растворимым антигенам — сывороткам крупного рогатого скота и лошадей, бактерий *Aeromonas punctata*, *Pseudomonas*

и *S. parathyrhi* A., эритроцитам человека, морской свинки и рыб. Он показал, что частота обнаружения и высота титров преципитинов, бактериоагглютининов, изо- и гетерогемагглютининов широко варьирует у разных видов, а также внутри вида. Им отмечены сезонные колебания в содержании этих антител, в частности увеличение их количества в летний период.

В сыворотке рыб встречаются не только естественные антитела к бактериям, но и к вирусам и к другим чужеродным телам. В сыворотке карпа выявлены агглютинины к сперме морского ежа (Gushing, 1945). Нормальные антитела к бактериям *S. thyphosa*, «O» эритроцитам человека и овец обнаружили также Леглер с соавт. (Legler et al., 1967) в сыворотке крови веслоноса (*Polyodon spatula*).

К приобретенным антителам относятся все иммуноглобулины, появляющиеся в организме животных в ответ на парентеральное введение чужеродных тел и у переболевших особей. Рыбы, как и все позвоночные животные, независимо от их систематического положения, способны синтезировать антитела к разнообразным по своей структуре и природе антигенам: бактериофагу (Dorson, 1972, 1983; Marchalonis, Cone, 1973; O'Neil, 1981), вирусам (Гончаров, 1949, 1953; Kinkelin et al., 1977; Fijan et al., 1977; Ahne, 1981; Meyers, 1983), сывороточным белкам (Лукьяненко, 1971; Richter, Ambrosius, 1973; Ingram, Alexander, 1979, 1980; Richter et al., 1980), гемоцианину (Litman, 1976; Ingram, Alexander, 1979), гаптену, введенному на носителе (Richter et al., 1973, 1980; Marchalonis, 1975, 1977; Fiebig, Ambrosius, 1975; Machulla et al., 1979), миеломному белку (Hodge et al., 1979); Emmrich et al., 1980; Richter et al., 1980), возбудителям бактериальных болезней: *Salmonicida salmonicida* (Anderson, 1974; O'Leary et al., 1978; Yamaguchi et al., 1980; Cipriano, 1983), бактериям *Aeromonas punctata* или *A. hydrophila* (Гончаров, 1962, 1967, 1970, 1971; Микряков, 1964а, 1970а; Владимиров, 1966; Лукьяненко, 1971; Гончаров и др., 1972; Микряков и др., 1974; Микряков, Трофимова, 1975; Микряков, Балабанова, 1979; Song et al., 1976; Schachte, 1978), *Vibrio anguillarum* (Schreckenbach, 1979; Nakai, Muroga, 1979; Anders, 1981; Kawano et al., 1983), *Proteus vulgaris* (Roales, Perlmutter, 1975), возбудителям, вызывающим у рыб болезнь Хангермана (Busch, 1978; Anderson et al.,

Paterson et al., 1981), колюмнарноз (Fujachara, Nakatani, 1971; Schachte, Moga, 1973), сапролегниоз (Davies, Lawson, 1982), бактериям из родов *Salmonella*, *Brucella*, *Streptococcus* (Neale, Chavin, 1971; Richter et al., 1973), и паразитам (Владимиров, 1967, 1971; Hines, Spira, 1974; Harris, Cottrell, 1976; Griffin, Davis, 1978; Mc Arthur, 1978). Благодаря успехам молекулярной биологии, иммунохимии, биохимии, биофизики, цитологии, в настоящее время разрабатываются не только морфологические основы антителигенеза, но и физико-химические свойства и структура антител.

### **Морфологические основы и закономерности антителигенеза**

Принято считать, что синтез антител, как защитная реакция животных на антигенные раздражители, является результатом деятельности клеток лимфоидно-макрофагальной системы (ЛМС). Процесс образования антител весьма сложен и связан с трансформацией и пролиферацией иммунокомпетентных клеток (Фриденштейн, 1964; Лебедев, 1971; Фриденштейн, Чертков, 1973; Гурвич, 1978; Петров, Михайлова, 1978; Фриденштейн, Лурия, 1978, Vignat, 1971). Если на теплокровных животных эти вопросы изучены довольно подробно, то на рыбах — недостаточно. Особенно это касается морфологических основ синтеза антител к бактериальному антигену и клеточных реакций, определяющих синтез антител к иммунизирующему агенту. В целях выяснения данного вопроса нами проведено детальное исследование роли некоторых тканей и органов, богатых клетками ЛМС, в синтезе антител. Мы попытались также выявить, какие процессы клеточной перестройки в популяциях клеток лимфоидной ткани связаны с образованием специфических иммуноглобулинов.

Для исследования данного вопроса использовали ткани почек, селезенки и печени. Антитела определяли в экстрактах этих органов (Микряков, 1968, 1970б; Гончаров, Микряков, 1968а; Микряков и др., 1974; Микряков, Балабанова, 1979).

Установлено, что основным местом синтеза бактериоагглютининов у карпа являются почки, затем селезенка (рис. 24). Как высота титров агглютининов, так и интенсивность образующихся антител в РЛТ (ретикуло-лимфо-

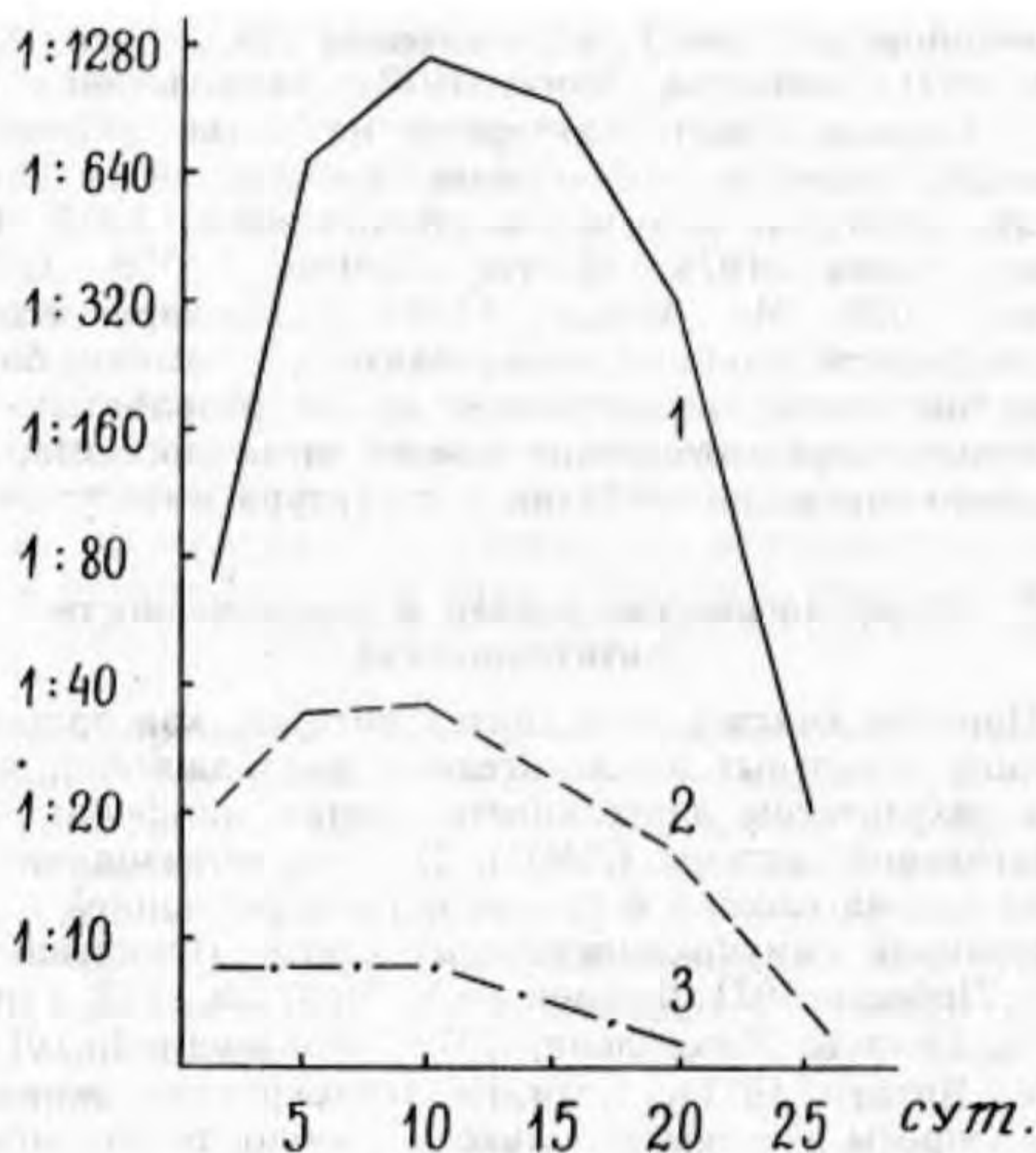


Рис. 24. Динамика образования антител в почках (1), селезенке (2) и печени (3) карпов.

По оси ординат — титры антител.

сравнении с экстрактами тканей селезенки (1:80—1:160) и печени (1:10).

Чтобы понять, какие процессы клеточной перестройки определяют синтез антител в организме рыб к бактериальному антигену, изучали клеточную реакцию в мазках-отпечатках почек (мезонефрос) карпа на разных этапах антителогенеза.

При рассмотрении клеточных трансформаций в ответ на парентеральное введение бактериального антигена обнаружены 3 типа следующих друг за другом реакций.

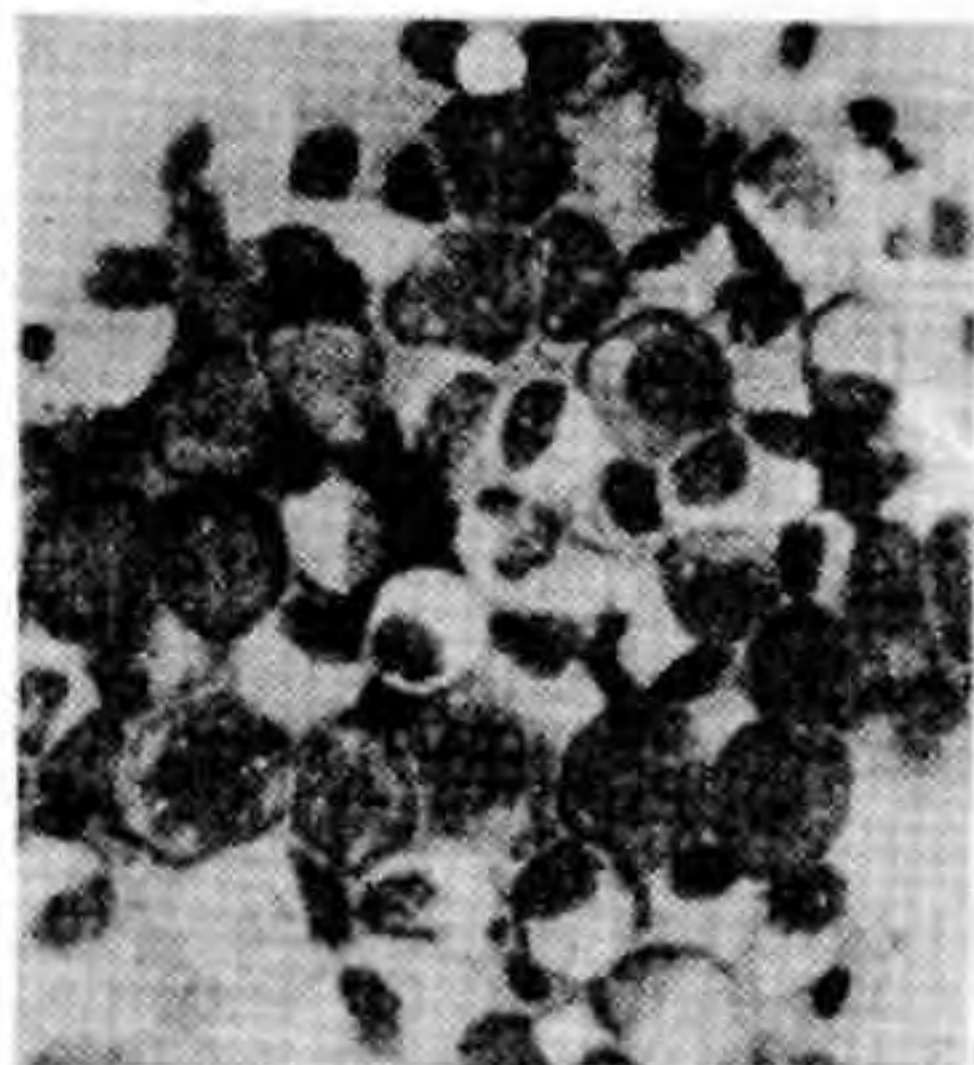
1. Макрофагальная реакция — возникает тотчас после инъекции антигена. Характерным для нее является увеличение относительного числа моноцитов, гранулоцитов и полиморфноядерных лейкоцитов в среднем до 70%

Относительное число иммунокомпетентных клеток  
в лимфондной ткани почек карпов до и после иммунизации, %

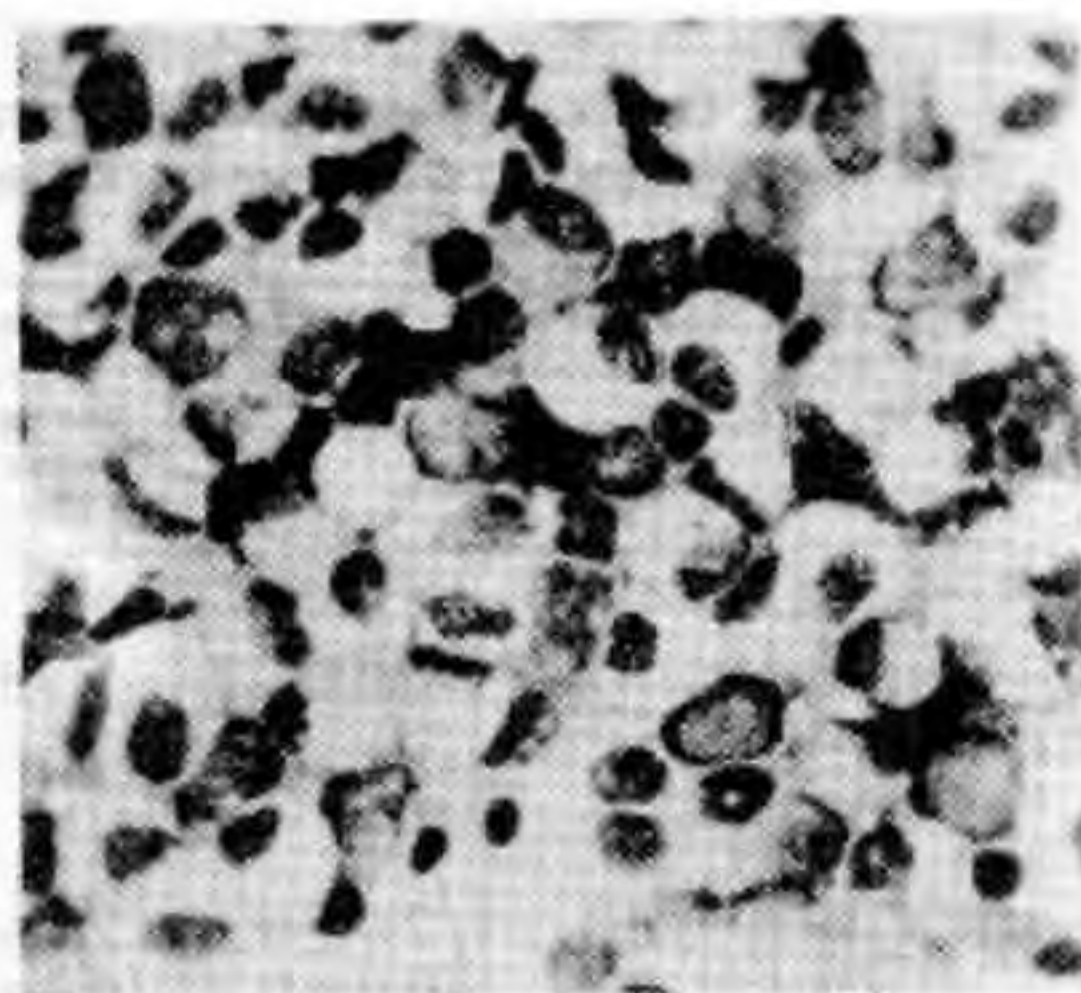
Время взятия пробы, ч	Количество рыб, экз.	Бласты	Зрелые и незрелые плазматиче- ские клетки	Клетки лимфоидного ряда	Клетки ре- тикулярного ряда	Гранулоци- ты, моноциты и полимор- фоядерные клетки
До имму- низации	23	$3.2 \pm 0.2$	$3.9 \pm 0.2$	$25.0 \pm 1.2$	$12.0 \pm 0.3$	$56.0 \pm 1.04$
После им- муниза- ции						
через 0.5	10	$2.0 \pm 0.15$	$2.1 \pm 0.1$	$16.0 \pm 1.04$	$9.0 \pm 0.1$	$70.1 \pm 1.2$
24	10	$10.9 \pm 0.2$	$6.0 \pm 0.1$	$32.0 \pm 1.4$	$10.0 \pm 0.3$	$41.0 \pm 1.2$
72	10	$10.9 \pm 0.2$	$9.3 \pm 0.3$	$41.0 \pm 1.04$	$10.0 \pm 0.28$	$29.0 \pm 1.5$
120	10	$9.0 \pm 0.16$	$10.6 \pm 0.2$	$43.0 \pm 1.5$	$8.0 \pm 0.1$	$30.0 \pm 1.5$
240	10	$6.2 \pm 0.1$	$12.2 \pm 0.3$	$44.0 \pm 0.2$	$9.0 \pm 0.02$	$30.0 \pm 0.9$
480	10	$4.0 \pm 0.1$	$8.4 \pm 0.4$	$38.0 \pm 1.9$	$12.0 \pm 0.21$	$38.0 \pm 1.2$
960	10	$3.1 \pm 0.1$	$4.5 \pm 0.2$	$27.0 \pm 1.0$	$13.0 \pm 0.3$	$53.0 \pm 1.6$

акции, видимо, связано с процессами парентерального переваривания бактерий клетками фагоцитарной системы и переводом корпускулярного антигена в растворимое состояние. В этот период резко снижается доля клеток лимфоидного ряда до 16% против 25% в контроле. Одновременно у опытных рыб уменьшается содержание плазматических и ретикулярных клеток (табл. 22). Снижение доли этих клеток в популяциях ИМК, возможно, связано с переходом их в антителосинтезирующие и с «залповым», синтезом гуморальных факторов нейтрализации бактериального антигена. Появление в популяциях клеток ЛМС большого числа гранулоцитов (рис. 25, 26, табл. 23) возможно обусловлено усилением воспалительного процесса в ответ на парентеральное введение антигена. Сходные результаты получили Фин и Нильсон (Finn, Nielson, 1971), при исследовании воспалительного процесса у радужных форелей после введения стафилококков в адьюванте Фрейнда.

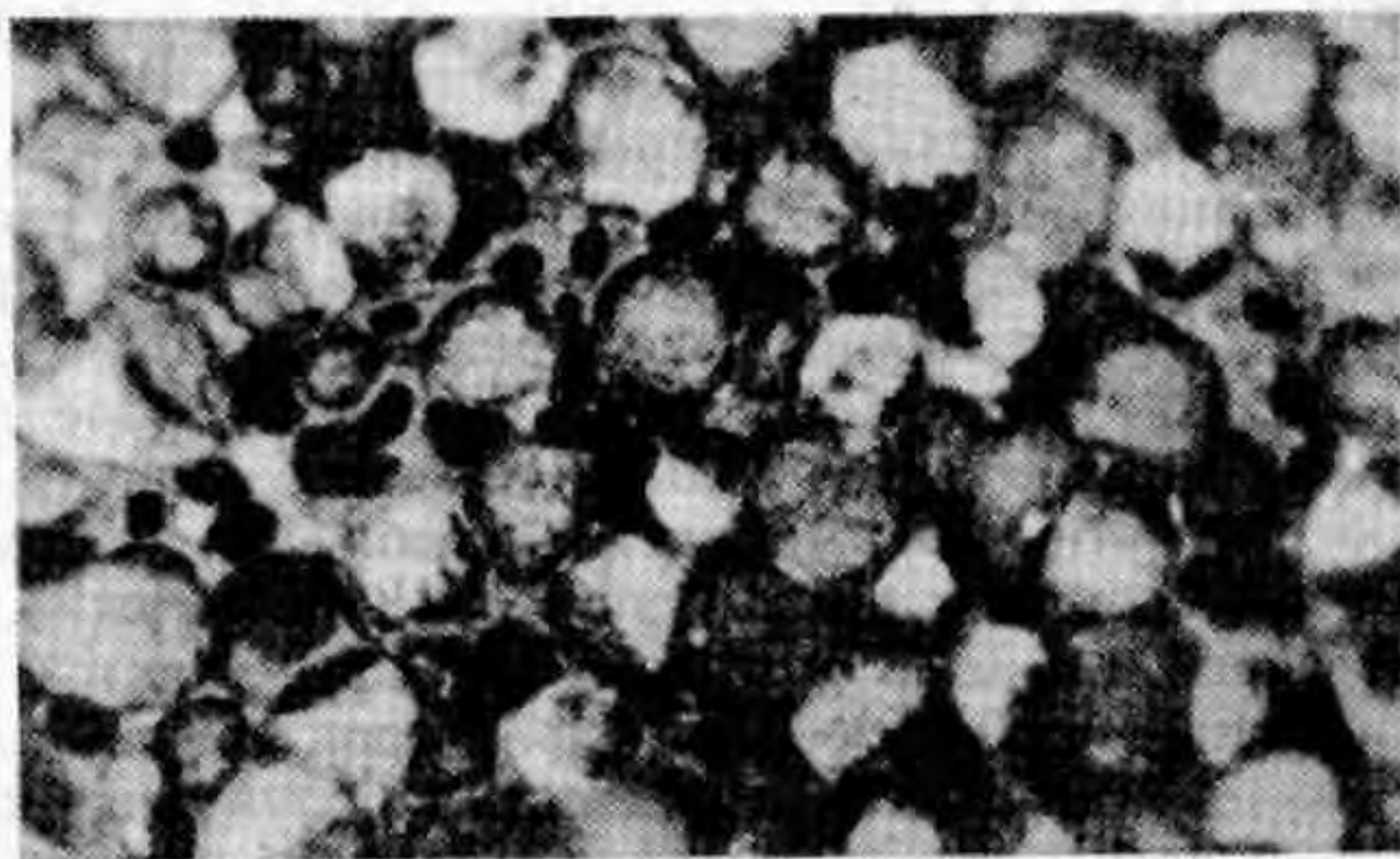
2. Вслед за макрофагальной реакцией наступает реакция бласттрансформации, которая характеризуется появлением в популяциях ИМК большого числа клеток типа бластов и усилением митогенной активности (рис. 25, табл. 23). Содержание этих клеток в организме опытных рыб, по сравнению с контрольными, возрастает почти в 3—4 раза. Повышение доли бластов отмечено нами в первые 5 сут. что, вероятно, связано с началом интенсифи-



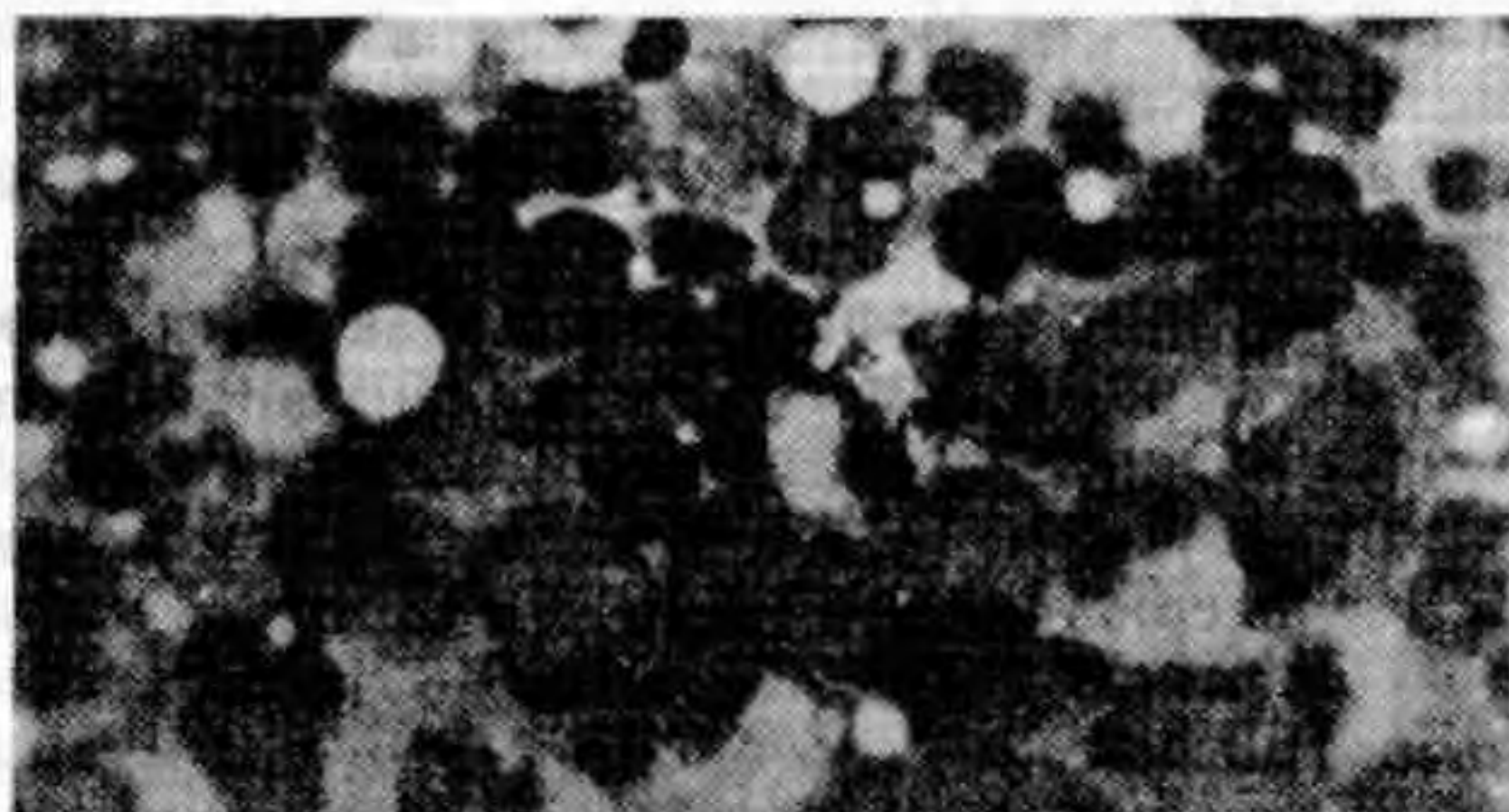
*a*

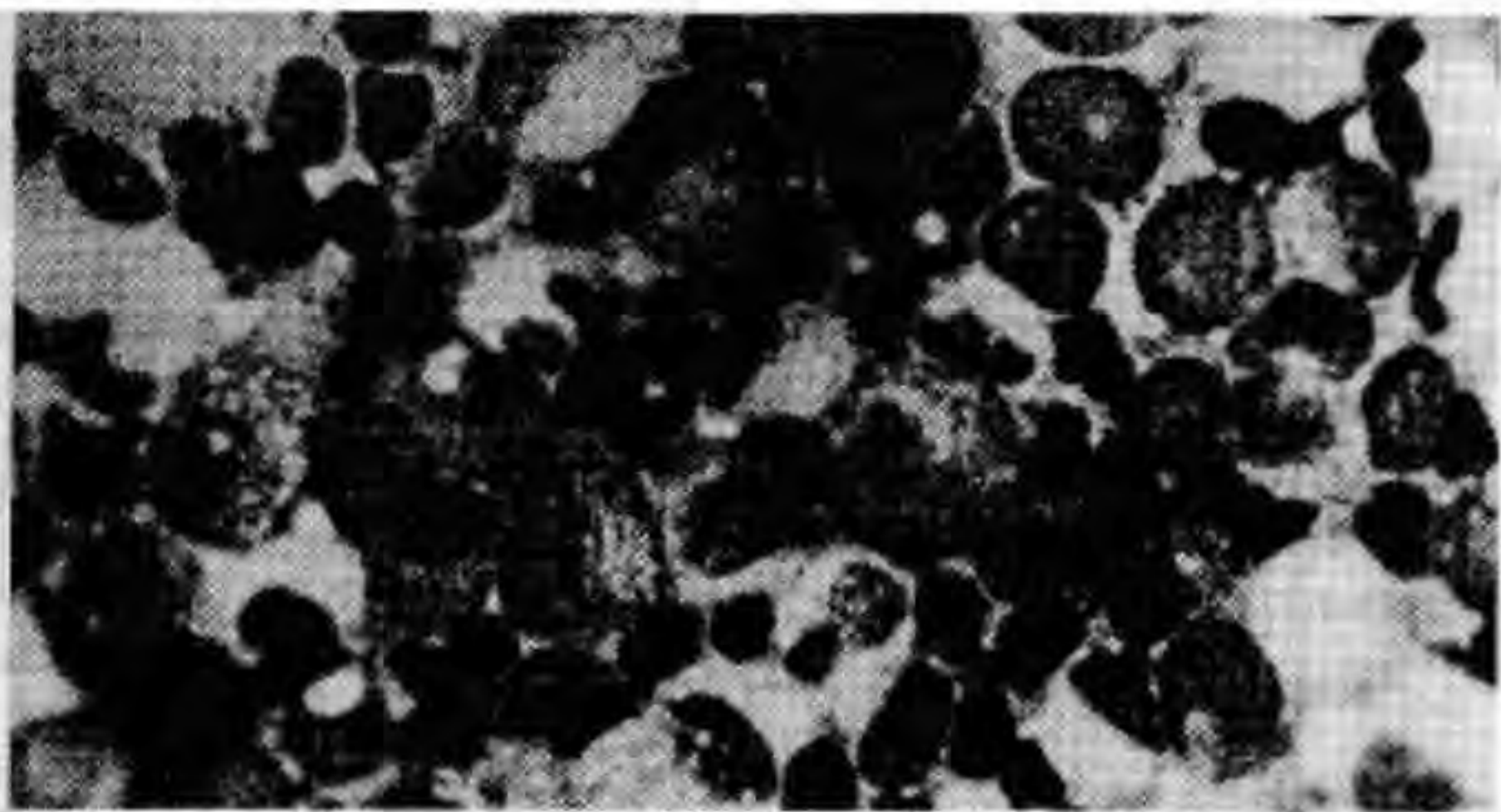


*b*



*c*





д

Рис. 25. Влияние иммунизации на состав и митотическую активность лимфоидных клеток почек.

Состав клеток: а — до иммунизации, б — через 0,5 ч, в, г — через 5—10 сут после введения антигена, д — делящиеся клетки. Окраска по Романовскому-Гимза; а — в, д — ок.  $\times 10$ , об.  $\times 90$ , г — ок.  $\times 7$ , об.  $\times 90$ .

АОК в сторону антителосинтезирующих. Одновременно с нарастанием доли бластов содержание гранулоцитов, моноцитов и полиморфноядерных лейкоцитов, напротив, снижается до 30% против 56% в контроле.

3. Третий этап реакции, который приходит вслед за бластреакцией, мы условно называли плазмоклеточным. Данный тип реакции от предыдущих отличается тем, что к концу 5—10 сут в популяциях ИМК возрастает доля плазматических клеток, более чем в 3—4 раза по сравнению с интактными (табл. 23). Параллельно с этим отмечено повышение доли клеток лимфоидного ряда. Содержание клеток ретикулярного ряда, наоборот, в это время снижается. Нарастание в популяциях ИМК зрелых и незрелых плазматических лимфоидных клеток свидетельствует об усилении процесса трансформации антителообразующих клеток и интенсификации синтеза антител. Параллельно с явлениями трансформации иммуноцитов в антителообразующие, как это установлено серологическими и биохимическими исследованиями, в экстрактах почек повышается содержание бактериоагглютининов и  $\gamma$ -глобулинов (Микряков и др., 1974). На 5—10-е сут от начала опыта количество  $\gamma$ -глобулинов в экстрактах почек повышается в среднем на 30% по сравнению с контролем. Бактериоагглютинины, видимо, связаны с  $\gamma$ -глобулиновой фракцией, поскольку наивысший уровень антител в экстрактах почек (рис. 26) нами выявлен в те



Влияние инактивированных *Aeromonas punctata* и вирулентных микроорганизмов *A. punctata* и *Candida albicans* на содержание ИМК в почках карпа, %

Время взятия пробы, ч	Число рыб	Ретикулярные клетки	Лимфо- и плазмобласты	Плазматические клетки	Гранулоциты и моноциты	Лимфоциты
-----------------------	-----------	---------------------	-----------------------	-----------------------	------------------------	-----------

После инъекции инактивированных бактерий *Aeromonas punctata* в дозе 1 млрд. бактериальных тел

До иммунизации	Число рыб	Ретикулярные клетки	Лимфо- и плазмобласты	Плазматические клетки	Гранулоциты и моноциты	Лимфоциты
	10±0.2	10±0.2	5±0.4	6±0.3	57±1.1	22±1.2
0.5	5	13±0.3	5±0.5	3±0.4	75±2.0	4±0.2
1	5	13±0.8	8±0.6	3±0.6	69±3.1	7±0.6
24	5	10±0.8	20±0.9	8±0.7	52±4.1	10±0.8
48	5	8±1.0	26±2.1	15±0.1	32±3.4	19±0.9
72	5	7±1.3	18±2.0	20±0.4	27±2.9	28±2.4
120	3	10±1.4	15±1.8	18±2.0	27±3.0	30±2.7

После инъекции вирулентных бактерий *Aeromonas punctata* в дозе 1 млрд. бактериальных тел

0.5	5	12±0.7	6±0.5	8±0.2	70±3.7	4±1.8
1	5	7±0.6	3±0.3	5±0.4	75±5.1	10±1.0
24	3	1±0.1	1±0.4	2±0.2	83±5.4	13±1.2
48	2	—	—	—	95±9.3	5±0.6
72						

Все рыбы погибли от сепсиса

После инъекции *Candida albicans* в дозе 1 млрд. микробных тел

0.5	5	9±1.0	7±0.8	5±0.3	60±4.6	19±2.0
1	5	12±0.8	6±0.8	6±0.4	70±7.2	6±0.3
24	5	9±0.8	5±0.4	4±0.2	75±6.3	7±0.4
48	3	5±0.4	6±0.3	3±0.3	78±8.1	6±0.4
72	2	3±0.1	5±0.2	3±0.1	84±8.4	5±0.3
120	2	4±0.2	3±0.2	2±0.2	87±9.2	4±0.3

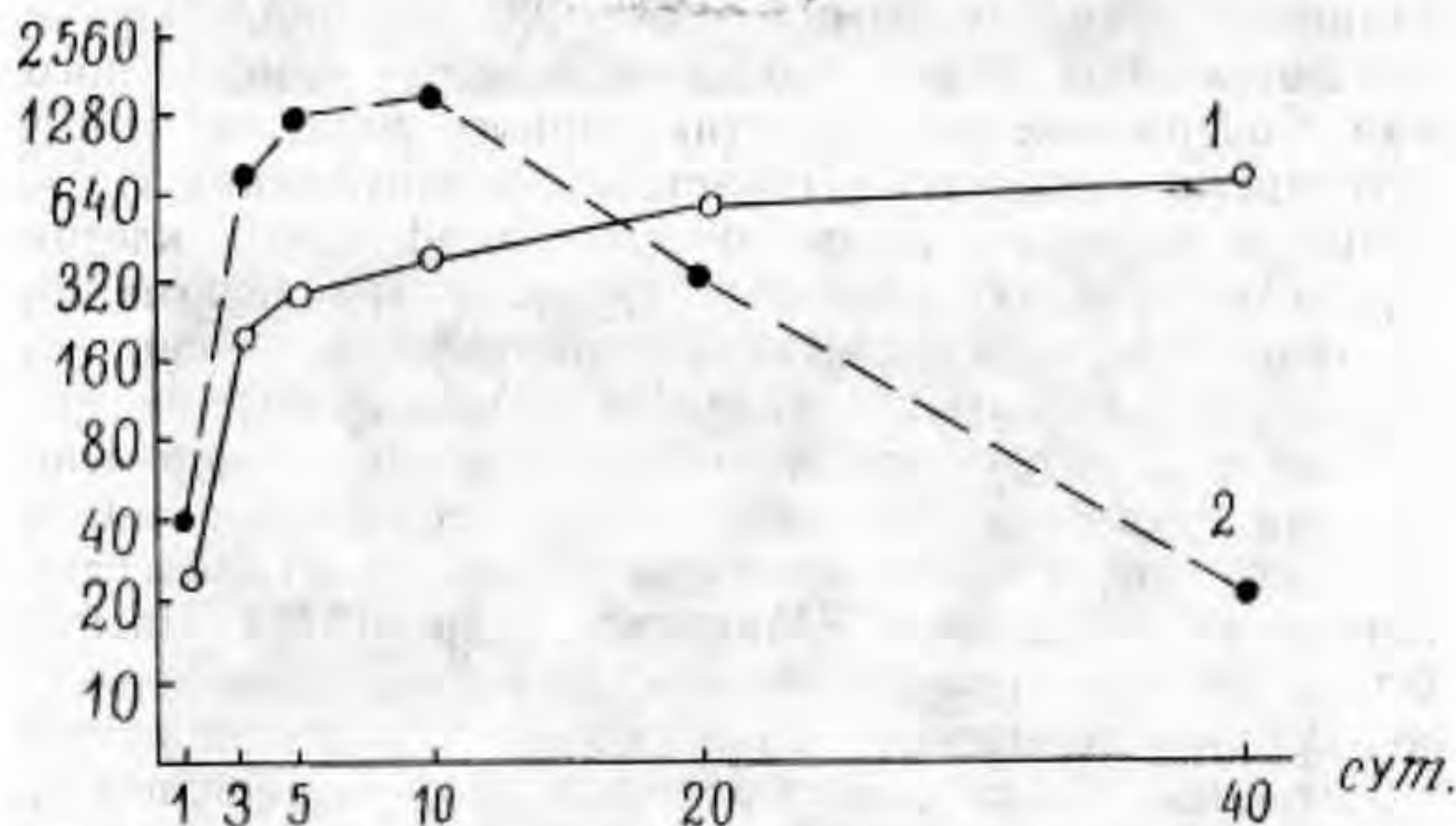


Рис. 26. Динамика нарастания уровня антител в сыворотке крови (1) и в

По истечении 20 суток от начала опыта процессы клеточной перестройки и трансформации завершаются. В случае введения в организм карпа равных инактивированным бактериям доз вирулентных микроорганизмов *Aeromonas punctata* и *Candida albicans* процессы клеточной перестройки нарушаются (табл. 23), а синтез антител подавляется (рис. 27). После введения вирулентных микроорганизмов, вызывающих 100%-ную гибель рыб, в популяциях ИМК почек количество лимфоидных и плазматических клеток уменьшается, а гранулоцитов и моноцитов — повышается.

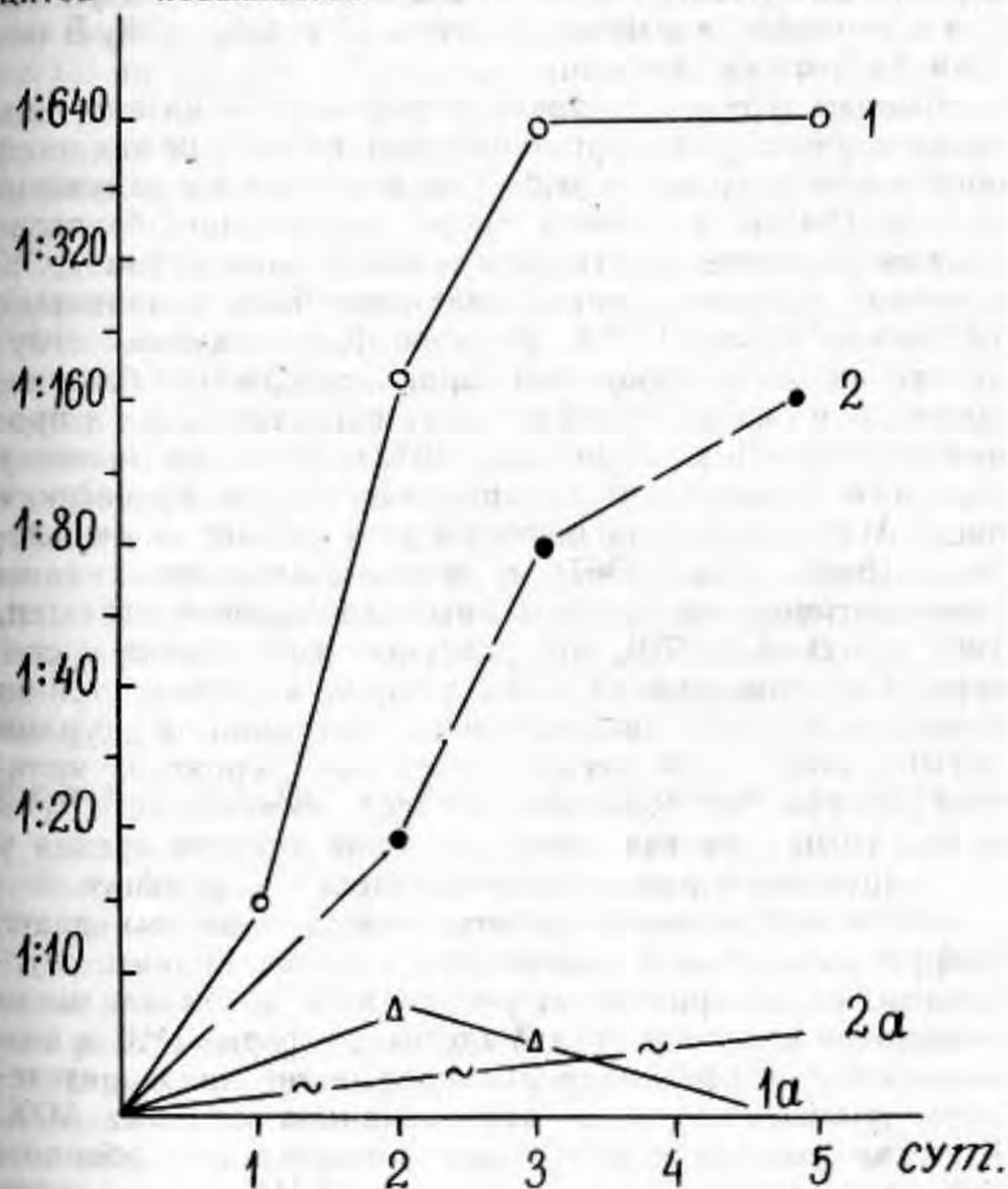


Рис. 27. Динамика образования антител в экстрактах почек (1, 1a) и в сыворотке крови (2, 2a) карпов после инъекции инактивированных бактерий *Aeromonas punctata* (1, 2) и грибов *Candida albicans* (1a, 2a).

Основным местом синтеза антител у карпа является ретикуло-лимфоидная ткань почек, затем селезенки.

Концентрация функционально активных иммунокомпетентных клеток в почках карпа выше, чем в других органах (табл. 18). Данные наших опытов (Микряков, 1970б) в дальнейшем получили подтверждение у ряда исследователей (Rijkers et al., 1980; Rijkers, 1981, 1982). На карпах, иммунизированных эритроцитами барана, они показали, что почки и селезенка отличаются между собой числом бляшкообразующих или антителообразующих (АОК) клеток. В селезенке ими обнаружено 5, а в пронефросе и мезонефросе — 53 и 40% АОК. В печени АОК отсутствовали.

Выводы о том, что почки у рыб — один из ведущих органов, где синтезируются антитела, видимо, не является общим для всех видов рыб. Так, в опытах на радужной форели (*Salmo gairdneri*) после иммунизации бактериальным 0-антигеном *Yersinia ruckeri* количество АОК в почках (мезонефросе) и селезенке было одинаковым (Anderson et al., 1978). В мезонефросе окуней, иммунизированных эритроцитами барана, содержание бляшкообразующих клеток было меньше, чем в селезенке и пронефросе (Pontius, Ambrosius, 1972). В то же время у ушастого окуня (*Lepomis macrochirus*) в пронефросе число АОК обнаружено почти в 2 раза больше, чем в селезенке (Smith et al., 1967). В острых опытах по влиянию спленоэктомии на синтез антител показано (Feggen, 1967; Yu et al., 1970), что удаление этого органа у синепера (*Lutjanus griseus*), как и у карпа, не отражается на способности рыб продуцировать антитела. У гурами (*Trichogaster trichopterus*) селезенка, вероятно, является одним из основных органов иммуногенеза (Yu et al., 1970), так как после удаления данного органа у них нарушается антителообразовательная функция.

Место интенсивного антителогенеза у разных видов рыб располагается в разных органах. Оно, видимо, обусловлено разнообразием встречающихся в том или ином иммунокомпетентном органе клеточных форм ЛМС и возможностью дифференцировки предшественников антителообразующих клеток до функционально активных АОК. К сожалению, отсутствие данных по изучению особенностей распределения и концентрации ИМК в организме разных по высоте организации и экологии видов рыб не позволяет объяснить имеющееся различие места лока-

Процесс образования антител связан с деятельностью клеток плазматического и лимфоидного рядов. Бактериальный антиген стимулирует процесс трансформации иммуноцитов в антителообразующие клетки, что, соответственно, отражается на составе и количестве ИМК. В латентный период происходит переработка антигена и накопление антителосинтезирующих клеток, а в индуктивный — выход антител в ток крови сопровождается одновременным снижением доли клеток плазматического и лимфоидного рядов в популяциях ИМК. Сходные результаты по влиянию бактериального антигена на процессы клеточной перестройки получили Ниил и Чевин (Neale, Chavin, 1971) на карасях (*Carassius auratus*), иммунизированных 0-антигеном *Salmonella thyphi* 0—901, затем они были подтверждены Т. В. Хохловой (1974) на стерляди и сазанах после вакцинации рыб инактивированными бактериями *A. punctata*.

Сопоставление наших исследований с исследованиями, полученными на теплокровных животных (Фриденштейн, 1964; Фонталин, 1967; Лебедев, 1971; Фриденштейн, Лурья, 1980), позволило установить ряд общих черт в характере проявления клеточной реакции и синтеза антител. Антителообразовательная функция у рыб и теплокровных животных связана с процессами трансформации и дифференцировки ИМК в сторону АОК. Интенсивному синтезу антител животных, в т. ч. и рыб, предшествует повышение доли лимфоплазмобластов и плазматических клеток. Эволюционно такой тип клеточной реакции, видимо, возник у многоклеточных животных, имеющих развитую лимфоидно-макрофагальную систему.

### **Физико-химические свойства и специфичность антител**

Независимо от происхождения антитела относятся к гликопротеидам и содержат различные количества олигосахаридов разного состава и строения (Незлин, 1972). Антитела, или иммуноглобулины, образующиеся в организме животных, в ответ на разные по природе антигенные раздражители, различаются между собой по первичной структуре полипептидных цепей, физико-химическими свойствами, антигенной специфичности. Международная комиссия Всемирной организации здравоохранения в 1964 г. предложила разделить иммуноглобулины на 5 классов: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE (Гурвич, Незлин, 1965; Незлин, 1972; Прокопенко, Равич-Щерба, 1974; Гурвич,

булины IgG, IgM и IgA, в свою очередь, подразделяются на подклассы или разновидности: IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgM<sub>2</sub>, IgM<sub>1</sub>, IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>. Классы иммуноглобулинов отличаются друг от друга полипептидными цепями, а подклассы — структурой С-концевого участка этих цепей. Каждая молекула иммуноглобулина состоит из 2 типов полипептидных цепей: «тяжелых» и «легких». Тяжелые цепи соответственно обозначаются греческими буквами  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  и  $\xi$ , а легкие в зависимости от типа  $\kappa$  и  $\lambda$ . Легкие и тяжелые цепи отличаются числом аминокислотных остатков и, соответственно, молекулярной массой (М.м.). В составе легких (L) цепей обнаружено около 210 аминокислотных остатков, м. м., 22,5 тыс. дальтон, а тяжелых («H») — 450 или 560, м. м. 50 или 70 тыс. дальтон. Каждая цепь по расположению аминокислот подразделяется на 2 резко отличающиеся друг от друга области: переменную (V) и константную или постоянную (C). С-области полипептидных цепей имеют идентичное для данного класса расположение аминокислотных остатков, тогда как V-области полипептидных цепей являются местом формирования активного центра антитела. Молекулы иммуноглобулинов разных классов отличаются молекулярной массой, константой седиментации, антигенными свойствами, содержанием углеводов, числом субъединиц и т. п. (Незлин, 1972; Прокопенко, Равич-Щерба, 1974).

Иммуноглобулины I-го класса IgG составляют основную массу иммуноглобулинов теплокровных животных. Под действием протеолитических ферментов и восстанавливающих антигенов (цистеина) молекула IgG расщепляется на 3 фрагмента. В двух первых находятся антигенсвязывающие центры, обозначаемые условно как Fab-фрагменты (м. м. 52 тыс. дальтон). Третий фрагмент (Fc) с молекулярной массой около 48 тыс. дальтон не имеет антигенсвязывающих центров и кристаллизуется при диализе против растворов с низкой ионной силой. Под действием сульфгидрильных реагентов и в присутствии мочевины молекула разрывается на отдельные полипептидные цепи: две тяжелые (H) и две легкие (L). Местом разрыва является дисульфидная связь (рис. 28). В составе углеводов встречаются гексозоаминосахара и сиаловые кислоты: фруктоза, манноза, галактоза, глюкозамин, N-ацетил-глюкозамин-сиаловая кислота (Незлин, 1972). В структуру входят 17 аминокислот: лизин, гисти-

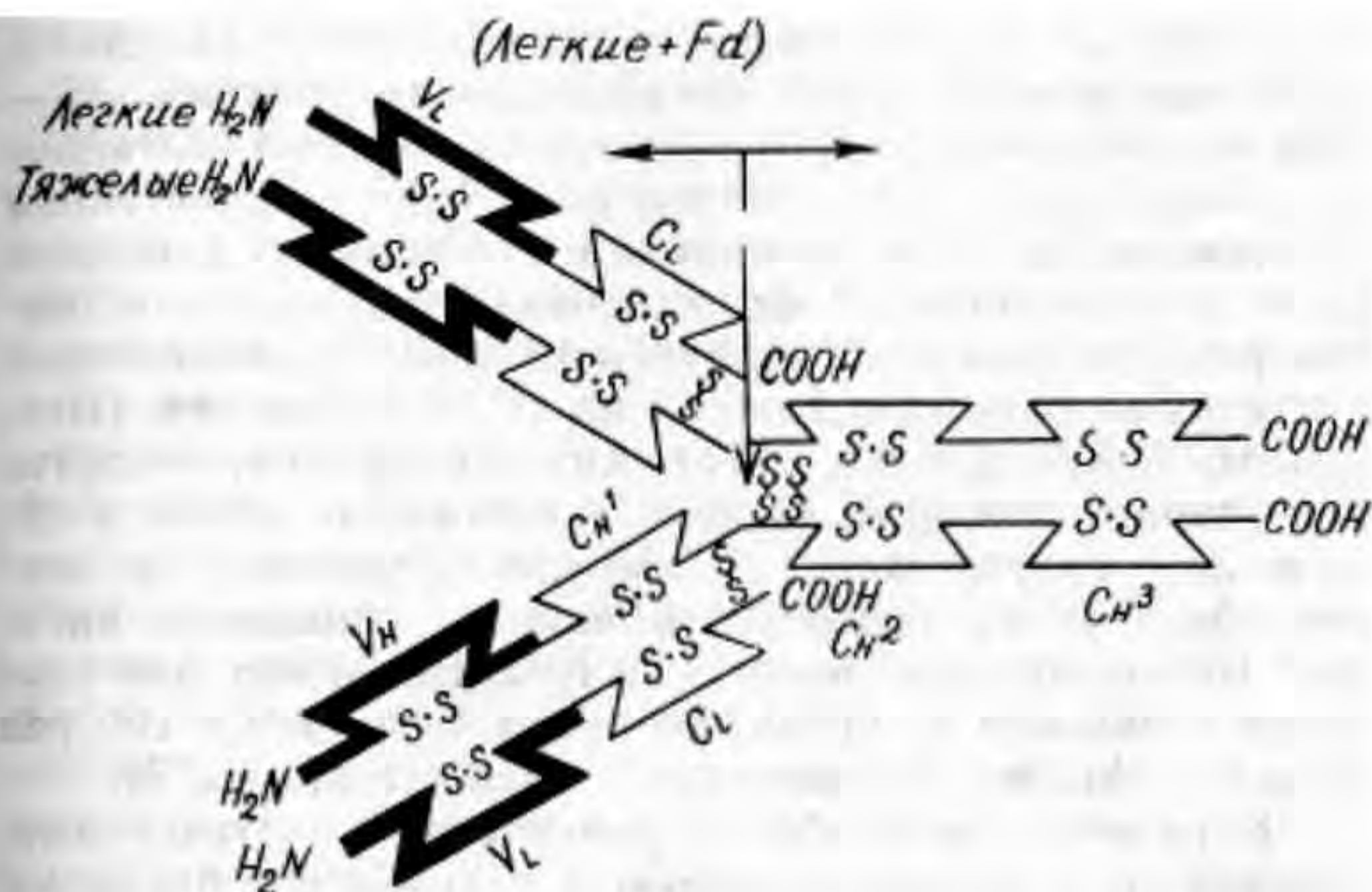


Рис. 28. Схема строения молекулы IgG (Milstein, Pink, 1970).

Толстые линии — вариабельные участки легких и тяжелых цепей, тонкие — константные участки, стрелки — место воздействия на молекулу.

глутаминовая кислота, пролин, глицин, аланин, валин, метионин, изо-лейцин, тирозин, фенилаланин, цистин и триптофан. Содержание аминокислот в составе IgG как внутри вида, так и между видами разных животных сильно колеблется. IgG относится к двухвалентным антителам и имеет 2 симметрично расположенных активных центра. Они способны присоединять детерминанты одной или двух молекул антигена. IgG-глобулины являются носителями антитоксичных, противовирусных и антибактериальных антител. *In vitro* они вызывают реакцию агглютинации, преципитации, связывания комплемента и взаимодействуют с гаптенами. Они очень устойчивы к воздействию температуры. Нагревание IgG-глобулинов при 75° в течение 30 мин не отражается на их биологических функциях. Антигенсвязывающая способность IgG-глобулинов ниже, чем IgM-глобулинов.

К следующему классу IgM относятся макроглобулины с высокой молекулярной массой 800 тыс. — 1 млн дальтон и константой седиментации 19S. При восстановлении (2-меркаптоэтанолом или цистеином) они распадаются на 79 субъединиц, а после глубокого гидролиза — на цепи (2 тяжелые и 2 легкие), соединенные друг с другом дисульфидными связями и нековалентными взаимодейст-

находится в виде пентамера, состоящего из 5 субъединиц, связанных между собой дисульфидными связями. 10—12% из общей массы IgM приходится на долю углеводов (Незлин, 1972). При электрофорезе IgM передвигаются быстрее, чем IgG и в основном концентрируются в области  $\beta_2$ - и  $\gamma_1$ -глобулинов. В функциональном отношении пентамер характеризуется наличием 10 антигенсвязывающих центров, по одному в каждой из 10 Fab-областей (Незлин, 1972; Riesen et al., 1975). Антигенные детерминанты, характерные для IgM, находятся в тяжелых цепях, а общие для других классов иммуноглобулинов — в легких. Авидность (способность антител связывать антиген) IgM-глобулинов выше, чем IgG. Например, для удаления сальмонел из крови животных требуется в 100 раз меньше IgM, чем IgG-антител (Земсков и др., 1977).

IgM-глобулины слабее взаимодействуют с токсинами, гаптенами, но хорошо реагируют в реакции агглютинации, преципитации, гемагглютинации, гемолиза и бактериолиза. Как указывает Марчалонис (Marchalonis, 1977), IgM-глобулин следует рассматривать как один из основных классов антител, встречающийся среди различных групп позвоночных животных (от пластиножаберных акул до млекопитающих).

Иммуноглобулин IgA в организме животных встречается в нескольких полимерных формах с молекулярной массой от 160 до 600 тыс. дальтон, содержание углевода в них равно 7,5—10%. В сыворотке крови IgA находится в большинстве случаев в виде мономера, но, кроме того, в ней встречаются полимерные и димерные формы (Koshland, 1975). Молекулярная масса мономера равна 160—180 тыс. дальтон, а мультимера — 600 тыс. Выделяют компоненты IgA с константами седиментации 7S, 11S, 13S, 15S и 17S. IgA в основном содержатся в различных секретах — слезах, слюне, желчи, молозиве, бронхиальных выделениях и кишечном соке. IgA-глобулин, выделенный из секретов, имеет константу седиментации 11S и отличается от таковых сывороточных белков наличием особого полипептида с молекулярной массой 50—60 тыс. дальтон, называемого секреторным или транспортным фрагментом — S — IgA. При электрофорезе IgA передвигается в области  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулинов. Секреторные IgA-глобулины в основном выполняют защитную функцию и обладают сильными бактерицидными и опсонизирующими свойствами. Они взаимодействуют также с вирусами. Недостаток

восприимчивым к условно патогенным бактериям и т. д.

IgD в сыворотке крови присутствует в очень низких концентрациях (Незлин, 1972; Прокопенко, Равич-Щерба, 1974). Молекулярная масса данного IgD колеблется в пределах 160—200 тыс. дальтон с константой седиментации 6.5—7.5. Данный иммуноглобулин чаще всего встречается при аутоиммунных заболеваниях: миеломе, хронических воспалительных процессах и т. д. Роль IgD остается неразгаданной. Наконец, 5-ый класс иммуноглобулина — IgE — синтезируется в основном клетками слизистой дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта. Большая часть молекул IgE связана с тучными клетками кожи и базофилами. Эти иммуноглобулины обуславливают выделение гистамина и реакцию анафилаксии и выполняют важную роль в патогенезе ряда аллергических заболеваний, бронхиальной астмы, аллергического ринита, атипичной экземы и т. д. В крови IgE обнаруживается в очень низких концентрациях — 0.01 мг в 100 мл сыворотки человека и приматов. IgE отличается от других классов иммуноглобулинов наличием общих и специфических антигенных детерминант.

Несмотря на установленное сходство в способности низших позвоночных животных синтезировать специфические антитела после воздействия на них антигенными раздражителями, иммуноглобулины у этих групп животных по сравнению с высшими позвоночными в основном представлены одним классом иммуноглобулинов — IgM. По физико-химическим свойствам и структурной организации эти иммуноглобулины очень гетерогенны. Молекулярная масса иммуноглобулинов низших позвоночных колеблется от 12, 16, 180 тыс. до 1 млн и выше дальтон. В соответствии с этим антитела у рыб по константе седиментации встречаются в виде 5S, 6S, 7S, 9S, 11S, 12S, 12.4S, 13S, 13.8S, 14S, 16S, 19S и 23S (Незлин, 1972; Ambrosius, 1967, 1981; Litman et al., 1976; Marchalonis, 1977). При мягком восстановлении дисульфидных связей высокомолекулярные иммуноглобулины у рыб распадаются на субъединицы с молекулярной массой 180 тыс. дальтон. В соответствии с числом образующихся субъединиц иммуноглобулины среди низших позвоночных подразделяются на моно-, ди-, тетра- и пентамеры. Мономеры, имеющие высокомолекулярную массу около 120—200 тыс. дальтон, встречаются среди всех групп рыб. Пентамеры и димеры характерны в основном для элазмобранхий и



щевых, костных ганондов и костистых рыб (Clem, Mc Lean, 1967; Ambrosius, 1973; Marchalonis, 1977).

Каждая субъединица высокомолекулярных и большинство низкомолекулярных иммуноглобулинов рыб, за исключением таковых у некоторых представителей круглоротых, в частности у миног под действием сульфгидрильных реагентов и в присутствии мочевины разрываются и расщепляются на отдельные полипептидные цепи — две легкие (L) и две тяжелые (H) (Marchalonis, Edelman, 1965, 1966; Frommel et al., 1971; Litman et al., 1976). Молекулярная масса полипептидных цепей обоих типов, по сравнению с таковыми у теплокровных, колеблется в широких пределах: L-цепей — от 20 до 25 тыс. дальтон, H-цепей — от 38 до 753 тыс. дальтон (Marchalonis, Cone, 1973; Litman, 1976; Marchalonis, 1977), тогда как у млекопитающих — около 20 и 50 тыс. дальтон соответственно (Незлин, 1972). В состав иммуноглобулинов рыб, как и высших позвоночных животных, входят углеводы — от 4.9 до 11.9% (Frommel et al., 1971). Следует отметить, что какой-либо связи между молекулярной массой иммуноглобулинов и содержанием углеводов среди рыб не выявлено. Доля углеводов у пентамеров колебалась в пределах 8—11%, а у тетрамеров — 5—6% (Litman, 1976; Hodge et al., 1979). Углеводы состоят из гексоз и гексозоаминов (Hodge et al., 1979). В составе гексоз обнаружена маноза и галактоза. Иммуноглобулины карпа по содержанию углеводов отличаются от таковых человека. У карпа отношение гексоз к гексозоаминам равняется 1:1, а у человека — 2:1. Углеводы тяжелых цепей ИМГ щуки состоят из фруктозы, маннозы, галактозы, глюкозамина, галактозамина и сиаловых кислот (Clegg et al., 1980). В первичной структуре полипептидных цепей иммуноглобулинов низших позвоночных, как и у млекопитающих, есть постоянная (С) и переменная (V) части или области, которые существенно отличаются между собой по последовательности аминокислот. Особенности аминокислотной последовательности V-областей при иммунизации определяют специфичность антигенсвязывающего центра. Расположение аминокислот в V-областях полипептидных H-цепей у пластиножаберных (акул) и млекопитающих существенно не отличается (Sarga et al., 1973; Кеное, Сарга, 1974), а между L-цепями такого сходства не выявлено. Например, гомология для аминокислотной последовательности между H-цепями

равняется 70%, тогда как между L-цепями — 35% (Litman et al., 1976).

Иммуноглобулины рыб, как и высших животных, имеют различную электрофоретическую подвижность. Методами иммуноэлектрофореза и простого электрофореза на различных носителях показано, что антитела у карпа концентрируются в области  $\gamma$ -глобулинов (Сорвачев и др., 1962; Балабанова, 1971; Микряков и др., 1974),  $\gamma_1$  и  $\gamma_2$  — у нотатени (Summerfelt, 1966),  $\gamma_2$  — у акулы и ската (Marchalonis, Edelman, 1965, 1966), угря (Finc, Drilhon, 1961), форели (Hodkins et al., 1967), карпа (Ambrosius, 1967; Ambrosius et al., 1967), нерки —  $\beta$ , радужной форели  $\beta_2$  и  $\gamma_1$  — радужной форели (Ingram, Alexander, 1979);  $\gamma_1$  —  $\gamma_2$  и  $\beta$  — у окуня (Ambrosius et al., 1967) и т. д.

Основной причиной появления антител с различной электрофоретической подвижностью, видимо, следует считать структуру антигенных раздражителей, используемых для иммунизации, видовые особенности рыб, молекулярную массу иммуноглобулинов и т. д. В качестве антигенного раздражителя используют растворимые и нерастворимые антигены: сывороточные и клеточные белки, бактериофаги, вирусы, бактерии, гемоцианин и т. д. Молекулярная масса специфических иммуноглобулинов колеблется в широких пределах. Иными словами, антитела рыб, образующиеся в ответ на парентеральное введение чужеродных тел, по физико-химическим свойствам гетерогенны. Несмотря на их гетерогенность, специфические иммуноглобулины низших позвоночных животных относятся к одному классу — IgM, подобно иммуноглобулинам высших позвоночных животных. Это обусловлено тем, что иммуноглобулины рыб, имеющие разную массу и образующие моно-, ди-, тетра- и пентамеры с м.м. 120—200 тыс. 320, 500—700, 800 тыс. — 1 млн. дальтон соответственно, не отличаются между собой по антигенной специфичности (Litman, 1976; Marchalonis, 1977). Четкие признаки деления иммуноглобулинов на классы появляются у двоякодышащих (Frommel et al., 1971; Litman et al., 1971; Marchalonis, 1977). Иммуноглобулины австралийской двоякодышащей *Neoceratodus forsteri* (Marchalonis, 1977) и африканской разновидности *Protopterus aethiopicus* (Litman et al., 1971) представлены двумя классами: IgG и IgM.

В отличие от теплокровных животных, большинство

чувствительные антитела, а 2-МЕ — резистентные антитела выявлены у незначительного числа видов. Караси после иммунизации бактериофагом ФХ174 вначале синтезировали 2-МЕ-чувствительные антитела, а затем 2-МЕ-резистентные (Uhr et al., 1962). Сходные результаты получены на окунях и карпах, иммунизированных гамма-глобулином человека (HGG) (Ambrosius et al., 1967). В то же время у карликовых сомов после инъекции HGG обнаружили только 2-МЕ-чувствительные антитела (Ambrosius et al., 1967). Тем не менее, способность рыб синтезировать 2-МЕ-резистентные антитела исключать не следует, поскольку Харрисом и Котрел (Harris, Cotrell, 1976) у камбалы и головаля Мак Артуром (Mc Arthur, 1978) у новозеландских угрей выявлены устойчивые 2-МЕ-естественные антитела к паразитарным антигенам (*Caryophyllaeus laticeps*, *Pomphorhynchus levis*, *Acanthobotrium quadraticum*, *Telogaster opisthorchis*). Аналогичные результаты получены на карасях при исследовании естественных антител к эритроцитам человека (Azzolina et al., 1982).

Из вышеизложенного видно, что рыбы синтезируют разнообразные по структуре и свойствам антитела. Следует отметить, что большинство исследователей для иммунизации использовали антигенные раздражители, не имеющие какой-либо связи с возбудителями болезней рыб: гемоцианин, сывороточные белки, гаптены на носителях, вирусы гриппа, бактериофаги, *Brucella abortus*, *Salmonella thyphimurium*, эритроциты барана.

Чтобы понять, какой тип иммуноглобулинов синтезируют карпы после иммунизации их бактериями *Aeromonas punctata*, нами проведено исследование влияния цистеина или 2-меркаптэтанола на сыворотки крови с заранее известным титром антител. Опыты ставили на сыворотках крови с титром агглютининов до 1:6400, полученных от однократно иммунизированных карпов. Сыворотку крови обрабатывали цистеином по методике Е. В. Чернохвостовой (1974). Антитела выявляли в реакции агглютинации. Показано, что обработка сыворотки иммунизированных рыб цистеином приводит к снижению титра агглютининов более чем в 4—10 раз (табл. 23). Результаты этих опытов свидетельствуют, что карпы к бактериальному антигену синтезируют высокомолекулярные IgM антитела. Естественные антитела или агглютинины, обнаруженные у интактных карпов, по-видимому,

иммуноглобулинам с константой седиментации 7S. Титр агглютининов до и после обработки цистеином у интактных рыб не меняется.

Таблица 24

Влияние 0.2 моль раствора соляно-кислого цистеина на содержание антител в сыворотке крови иммунных и неиммунных карпов, титры агглютининов

Номер сыворотки	Разведение								
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
1	+++	++	+	+	+	+	0	0	0
	+	+	0	0	0	0	0	0	0
2	+++	+++	++	+++	++	0	0	0	0
	+	+	+	0	0	0	0	0	0
3	++	++	+++	+	+	+	+	+	0
	+	+	+	0	0	0	0	0	0
4	+++	++	++	+	+	+	+	+	0
	+	+	+	0	0	0	0	0	0
5	+++	++	+	+	+	+	+	+	0
	++	+	+	+	+	0	0	0	0
6	+++	++	++	++	+	+	+	—	—
	+	+	+	+	0	0	0	—	—
7	++	+	+	+	+	+	0	—	—
	+	+	+	0	0	0	0	—	—
8	++	++	+++	++	+	+	—	—	—
	0	0	0	0	0	0	—	—	—
9*	++	+	+	+	+	0	0	0	0
	++	+	+	+	+	0	0	0	0
10*	+	+	+	0	0	0	0	0	0
	+	+	+	0	0	0	0	0	0
11*	+	+	+	0	0	0	0	0	0
	+	+	+	0	0	0	0	0	0
12*	+	+	0	0	0	0	0	0	0
	+	+	0	0	0	0	0	0	0
13*	++	+	+	0	0	0	0	0	0
	+	+	0	0	0	0	0	0	0

Примечание. Над чертой — титры агглютининов до обработки сыворотки цистеином, под чертой — то же после обработки, \* — сыворотка крови интактных карпов; + — положительная реакция, 0 — отсутствие реакции взаимодействия с антигеном.

Таким образом, карпы при иммунизации их бактериями *A. punctata* синтезируют цистеин-чувствительные или макроглобулиновые антитела. В то же время, мы не знаем, происходит ли смена синтеза макроглобулиновых антител у иммунных карпов на цистеин-резистентные как это

рыб (Uhr et al., 1962; Ambrosius et al., 1967). Поскольку в сыворотке карпа встречаются нормальные цистеин-резистентные бактериоагглютинины, исключать возможность перехода синтеза антител из одного типа в другой у иммунных рыб, видимо, не следует.

**Специфичность антител.** Под специфичностью антител следует понимать способность иммуноглобулинов вступать в реакцию взаимодействия с тем антигеном, который используется для иммунизации животных, в т. ч. и рыб. Вопрос о специфичности антител, как и способность рыб отвечать антителообразованием на парентеральное введение антигена в 60-х годах нашего века среди ученых активно дискутировался. Одни полностью отрицали возможность синтеза специфических антител у рыб (Аветикян, 1958, 1959), другие сомневались в их специфичности (Сиротинин, 1964; Тец, 1964; Лукьяненко, 1966, 1971), а большинство авторов придерживалось противоположной точки зрения (Гончаров, 1949, 1962, 1967; Владимиров, 1966, 1967, 1971; Гончаров и др., 1972; Ambrosius, 1967, 1981; Litman, 1976; Marchalonis, 1977; Richter, Ambrosius, 1978; Machula et al., 1979; Hädge et al., 1979; Richter, Broep, 1984; Espelid et al., 1987). О способности рыб синтезировать специфические антитела к антигену свидетельствуют результаты наших исследований. Это было показано при изучении степени комплементарности антител к гомологичным и гетерологичным антигенам в перекрестной реакции агглютинации и иммунофиксации антигена на хроматографической бумаге по методу Кастанеда (Губина, 1964). Анализ перекрестной реакции агглютинации сыворотки крови от 3-кратно иммунизированных карпов показал, что титры антител к гомологичным штаммам *Aeromonas punctata* были в несколько раз выше, чем к гетерологичным (табл. 25).

Таблица 25

**Уровень агглютининов в сыворотках иммунных карпов к *Aeromonas punctata***

Категории бактерий	Номер штамма	Титр антител		
		средний	минимальный	максимальный
Гомологичные	123	1:630 ± 1:64	1:160	1:2560
Гетерологичные	74	1:216 ± 1:98	1:40	1:640
— » —	960	1:42 ± 1:100	1:10	1:160

Невысокие титры антител, выявленные к гетерологичным

антителам, встречающимся в сыворотке крови интактных карпов (Микряков, 1964а, б). В контрольных опытах с сыворотками интактных карпов нормальные антитела выявлены в тех же разведениях, что и в опытах с гетерологичными штаммами микробов.

В другой серии опытов, поставленных нами по методу Кастанеда (Микряков, 1970а; Гончаров и др., 1972), получены те же результаты, что и в перекрестной реакции агглютинации (рис. 3, табл. 26), с той лишь разницей, что естественные антитела не играют какой-либо роли в фиксации антигена на хроматограмме. Всего использовано 56 сывороток от 2-кратно иммунизированных и 30 сывороток от неиммунизированных карпов. Сыворотку собирали через 10—15 сут после второй иммунизации рыб. Анализы производили в 10-кратной повторности с каждой сывороткой с гомологичными (*A. punctata*, штамм 123) и гетерологичными (*Pseudomonas fluorescens*, штамм 74 и *Escherichia coli communis*, штамм 960) бактериями. Всего получено около 2.5 тыс. хроматограмм. После нанесения иммунной сыворотки на гомологичный антиген фиксация антигена произошла в 540 случаях из 560, тогда как гетерологичные бактерии этими сыворотками не фиксировались, несмотря на то, что в сыворотках рыб были обнаружены агглютинины к этим бактериям (табл. 25).

Таблица 26

Сравнительные данные о взаимодействии сыворотки рыб с бактериями в реакции иммунофиксации по Кастанеда

Категории бактерий	Номер штамма	Иммунная сыворотка			Нормальная сыворотка				
		количество анализов	+	±	—	количество анализов	+	±	—
Гомологичные	123	560	540	20	—	300	0	0	300
Гетерологичные	74	560	0	7	553	300	0	0	300
	960	560	0	0	560	300	0	0	300

Примечание. + — полная фиксация антигена, ± — неполная фиксация антигена (высота столба ниже, чем в контроле), — — отсутствие фиксации антигена (рис. 3).

Полученные результаты достоверно подтверждают способность карпов синтезировать специфические иммуноглобулины в ответ на введение в организм корпускулярного антигена.

ции неспецифические антитела в сыворотках иммунных рыб мы объясняем наличием в структуре гомологичного микроба комплекса специфических и неспецифических антигенных конфигураций, т. е. таких, которые могут быть и у гетерологичных бактерий. Присутствие групповых антигенов у исследуемых бактерий, видимо, приводит к синтезу антител к другим бактериям. Такое явление имеет место и среди теплокровных животных (Жуков, Вережников, 1964). Однако фиксация (%) антигена на хроматограмме иммунной сыворотки крови, взятой через 5, 10, 20, 30 и 40 сут после второй иммунизации карпов *Aegloptas punctata* была различной. Сыворотки крови, собранные через 5 и 10 сут от момента иммунизации, полностью фиксировали бактериальный антиген на хроматографической бумаге, тогда как через 40 сут доля антигенфиксирующих сывороток падает до 10%. Причем, снижение доли рыб, сыворотка которых не полностью задерживала антиген на хроматограмме, не сопровождалось сколько-нибудь заметным изменением титра агглютининов. Уровень бактериоагглютининов во всех случаях, как показали исследования, колебался в пределах 1:320—1:1280. Изменение антигенфиксирующей способности иммунных сывороток, по-видимому, обусловлено аффинностью или валентностью бактериоагглютининов. Чем выше аффинность антител, тем сильнее проявляется их антигенсвязывающая способность (Незлин, 1972; Земсков и др., 1977). Аффинность антител непосредственно зависит от молекулярной массы (Незлин, 1972; Земсков и др., 1977). Чем она выше, тем сильнее проявляется антигенсвязывающая способность антител. Данные этих опытов позволяют косвенно судить о том, что карпы синтезируют вначале макроглобулиновые антитела с высокой молекулярной массой и константой седиментации 19S, затем с низкой молекулярной массой. Поэтому неспецифические к гомологичному антигену агглютинины, выявленные нами в сыворотках крови карпов, видимо, следует относить к естественным меркаптоэтанол-резистентным антителам с низкой степенью аффинности и валентности.

Таким образом, рыбы синтезируют специфические антитела, что согласуется с данными многочисленных авторов (Гончаров, 1962, 1967; Владимиров, 1966, 1971; Ambrosius, Schäker, 1964; Ambrosius, 1967; Litman, 1976; Fijan et al., 1977; Kinkelinn et al., 1977; Marchalonis, 1977; Anderson et al., 1979; Richter et al., 1980;

Специфические антитела, выявленные у карпа против гомологичного штамма одного и того же вида бактерий *Aeromonas punctata*, свидетельствуют об их серологической разнокачественности, что согласуется с данными других авторов (Лобунцов, 1972, 1974; Круг, 1979). Исследованиями К. А. Лобунцова (1972) установлено, что бактерии *A. punctata*, вызывающие бактериальную форму краснухи или аэромоноз карпов, относятся к двум серотипам, а по данным Круг (Круг, 1979) — к девяти, т. е. бактерии *A. punctata* отличаются между собой числом и качеством антигенных детерминант. Разные штаммы *A. punctata* имеют неодинаковый набор токсинов и с различной интенсивностью разрушают сахара (Коган, 1981). Согласно его данным, не все штаммы *A. punctata*, выделенные из организма больных рыб, декарбоксилировали лизин, неодинаково интенсивно росли в присутствии глюкозы, сахарозы, мальтозы, маннита, маннозы и арабинозы и синтезировали фибринолитический фермент и т. д. Из 110 штаммов, вирулентных для рыб, только 87 оказались патогенными для белых мышей.

### **Влияние различных факторов среды на интенсивность антителогенеза**

Если исходить из общепринятого положения о том, что синтез антител подчиняется тем же закономерностям, что и синтез белка в живой природе (Здродовский, 1969), то интенсивность этого процесса должна зависеть от внешних и внутренних факторов, регулирующих метаболические реакции. Их знание является необходимым условием, позволяющим регулировать и контролировать процессы иммуногенеза.

Из многочисленных факторов среды, оказывающих влияние на функционирование всех систем организма, в том числе на иммунную, нами изучена роль голодания, температуры и присутствия токсических веществ. Эти факторы, на наш взгляд, оказывают наибольшее влияние на жизненные функции рыб.

**Влияние голодания.** Предпосылкой для постановки подобных опытов послужило то, что перезимовавшие или истощенные карпы, по данным наблюдений Флеминга (Fleming, 1958), не способны приобретать иммунитет к краснухе. Отрицательные результаты, полученные на выюнах, карпах и карасях (Аветикян, 1958, 1959; Тец, 1964), мы также объясняем содержанием рыб на голодной



повышается доля рефрактерных особей от 75 до 90% (Fijan, Sventhic, 1964). Фактор питания, по-видимому, играет существенную роль в антителиогенезе. Для более полного представления о синтезе антител у рыб мы исследовали влияние питания на интенсивность антителиообразования (Микряков, 1969а; Гончаров, Микряков, 1970). Опыты ставили на голодающих и «сытых» карпах-сеголетках (по 30 экз. рыб). Для сравнения интенсивности антителиогенеза с физиологическим состоянием организма рыб параллельно определяли содержание общего белка в сыворотке крови и коэффициент упитанности по Фулто-ну. У голодающих рыб, имеющих низкие показатели общего белка сыворотки крови и коэффициента упитанности, антитела в среднем выявлены при более низких разведениях сыворотки крови (1:55), чем у получающих корм:

Категория рыб	Средний титр антител	Число рефрактерных особей	Общий белок, %	Коэффициент упитанности
Опытные (голодные)	1:55	10	$2.21 \pm 0.1$	$1.7 \pm 0.03$
Контрольные	1:463	0	$6.7 \pm 0.1$	$2.1 \pm 0.08$

Результаты данных опытов позволяют утверждать, что интенсивность антителиогенеза зависит от условий содержания рыб. При голодании синтез антител задерживается и приводит к увеличению доли рыб, антителиообразовательная функция которых задерживается или подавляется. Сходные результаты по влиянию голодания на антителиогенезе рыб получены В. И. Лукьяненко (1971).

**Влияние температуры.** Этот вопрос изучен наиболее полно. При низких температурах у угрей, иммунизированных бактериями *Vibrio anguillarum*, интенсивность антителиогенеза снижается (Nybelin, 1934, 1968). У опытных рыб, находящихся при температуре 7—9°C, антитела выявлены в разведениях сыворотки 1:20 и 1:40, тогда как при 15—20°C — от 1:320 до 1:24480. Аналогичные результаты получены на карпах, карликовых сомиках, форели, кижуче и окунях (Гончаров, 1962; Лукьяненко и др., 1967; Лукьяненко, 1971; Smith, 1940; Avtalion, 1969, 1981; Rijkers et al., 1981).

В одной из серий опытов нами еще раз было показано замедляющее действие низкой температуры на интен-

Температура воды, °C	Титр антител	
	средний	колебания
10—12	1:35 ± 1:101	1:10 ± 1:80
18—22	1:2250 ± 1:378	1:320 ± 1:10240

У рыб, содержащих при температуре 10—12°C, через месяц после их иммунизации антитела обнаружены при более низких разведениях сыворотки, чем у рыб, находящихся при температуре 18—22°.

Механизм действия температуры на синтез антител у рыб, видимо, сводится к регуляции функций антигенразрушающих структур, осуществляющих перевод корпускулярного антигена из неиммуногенной формы в растворимую или иммуногенную форму, которая, как известно, стимулирует трансформацию предшественников АОК в антителосинтезирующие клетки (Фриденштейн, 1964; Незлин, 1972; Фриденштейн, Чертков, 1969; Петров, Хаитов, 1976). О снижении интенсивности разрушения антигена при низких температурах свидетельствуют данные исследований по выведению продуктов разложения меченых микробов из организма карасей (Трофимова, Микряков, 1973). При температуре 4, 10°C процесс разрушения бактерий подавляется, а при 18—22°C нарастает. При низких температурах у рыб снижается не только интенсивность образующихся антител, но и число АОК в органах (селезенка и почки), богатых ИМК, что подтверждают исследования на карпах, содержащихся при температурах 12, 16, 18, 20 и 24°C (Rijkers, 1980, 1981).

С изменением температуры воды меняется не только интенсивность антителогенеза, но и эффект проявления иммунологической памяти или интенсивности анамнестической реакции (Avtalion, 1969, 1981; Rijkers et al., 1980, 1981). С понижением температуры воды ниже 20°C у карпов, иммунизированных эритроцитами барана, исчезают различия в инкубационном периоде и количестве АОК между первичной и вторичной иммунизацией (Rijkers et al., 1980). У рыб, содержащихся при температуре 20°C и выше, после вторичной иммунизации, сокращается инкубационный период, а интенсивность антителогенеза резко возрастает.

У холодолюбивых и теплолюбивых рыб оптимальные температуры, стимулирующие интенсивное образование антител, различны. Синтез антител у холодолюбивых рыб

при более низкой температуре. Например, налиим хорошо вырабатывает антитела при температуре 6—9°C (Гончаров, 1967). У теплолюбивых (каarp, карась, угорь, карликовые сомики) антитела при температуре воды ниже 10°C либо вообще не вырабатываются, либо процесс их образования сильно затормаживается. Из проведенного анализа следует, что интенсивное образование антител происходит при той температуре, которая является оптимальной для роста, развития и размножения данного вида рыб. Поэтому при постановке опытов или при проведении массовых вакцинаций следует обращать внимание не только на температуру, но и на видовые и биологические особенности исследуемых рыб.

**Влияние токсических веществ.** Рыбы на протяжении всего онтогенеза испытывают воздействие разнообразных факторов внешней среды. Рыбы встречаются как с качественно большим разнообразием компонентов среды, так и, в некоторых случаях, с большей интенсивностью воздействия каждого компонента. Под качественно большим разнообразием Н. Н. Строганов (1979) подразумевает и те новые компоненты, поступающие в водоемы в виде отходов промышленных, коммунальных, сельскохозяйственных предприятий, и т. д., которые, согласно современным представлениям, относят к группе токсических веществ. Последние обуславливают качественные и количественные изменения физико-химических и биологических параметров водных экосистем. Все изменения, происходящие в водоемах под воздействием токсических веществ, соответственно влияют на выживаемость рыб и их адаптационные возможности (Строганов, 1962, 1979; Метелев и др., 1971; Лукьяненко, 1983; Маляревская, 1979; Флеров и др., 1982; Флеров, 1989; Wedemeyer et al., 1981).

Многообразно влияние токсических веществ на организм рыб: подавление функций всех систем жизнеобеспечения, нарушение процессов роста, размножения, снижение устойчивости к заразным болезням, изменение поведенческих функций и т. д. Иными словами, токсические вещества в водоемах создают стрессовые ситуации, которые являются неблагоприятными для функционирования механизмов гомеостаза и жизнедеятельности рыб. Отмеченные вначале В. И. Лукьяненко и Б. А. Флеровым (1963), затем В. Л. Владимировым, Б. А. Флеровым (1974) и Сниежко (Spiezko, 1974) факты повышения

(сапролегниоз, аэромоноз, ихтиофтириоз и т. д.) при воздействии на них токсическими веществами свидетельствуют о снижении функций механизмов иммунного гомеостаза. Чтобы понять, каким образом отражается присутствие в воде токсических веществ на функционирование механизмов иммунитета, нами проведено исследование влияния фенольных загрязнений на антителообразовательную функцию у рыб (Гончаров, Микряков, 1968а, 1970; Микряков, 1970в). Опыты ставили в двух вариантах на сеголетках карпа. В качестве токсиканта использовали фенол при ежесуточно заданных субтоксических концентрациях 3.18, 6.25 и 12.5 мг/л. Воду в опытных и контрольных аквариумах меняли ежедневно. Наблюдение за рыбами проводили в течение 1.5—3 мес. Рыб иммунизировали 3-кратно внутрибрюшными инъекциями с 5-суточным интервалом вакциной из бактерий *A. punctata* в дозе 150—220 млн. бактериальных тел. На 45-е сут после последней инъекции всех рыб забивали, брали у них кровь и в сыворотке определяли уровень антител, используя реакцию агглютинации.

Таблица 27

Уровень агглютининов у карпов, содержащихся при концентрации фенола 12.5 мг/л

№ группы	Категория рыб	Количество особей	Титры антител					
			по однобалльной системе			по трехбалльной системе		
			Средний титр	Кэф-фициент вариации	Уровень значимости	Средний титр	Кэф-фициент вариации	Уровень значимости
1	Голодные опытные	30	1:19±1:170	60	0.08	1:1±1:13	74	0.01
3	контрольные	30	1:55±1:390	67		1:16±1:24		
2	Сытые опытные	15	1:102±1:470	34	0.01	1:24±1:172	120	0.01
4	контрольные	15	1:373±1:1670	56		1:69±1:206		

Отмечено отрицательное иммуносупрессивное действие фенола на антителообразовательную функцию карпов (табл. 27, рис. 29, 30). Однако степень его влияния на синтез антител зависела от заданной концентрации. Фенол в концентрациях 3.1 и 6.25 мг/л не оказывал существенного супрессивного действия на процессы обра-

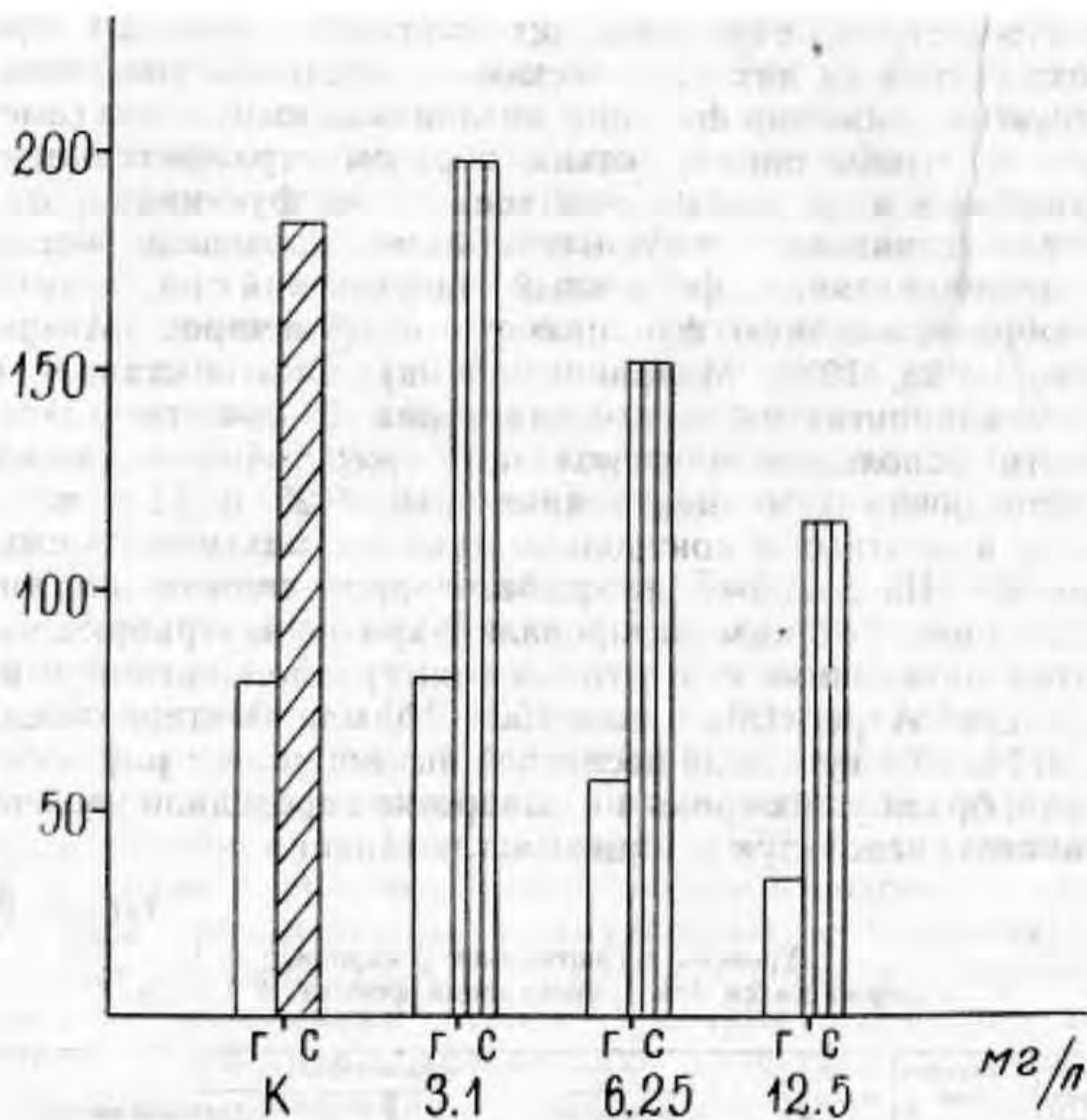


Рис. 29. Влияние фенола на интенсивность антителиобразования карпов.

По оси ординат — средние значения суммы баллов реакции агглютинации, по оси абсцисс — заданные концентрации фенола, мг/л, К — контроль; г — голодающие рыбы, с — «сытые».

тающее действие отмечено только при концентрации 12.5 мг/л (табл. 27).

В дополнительной серии опытов мы изучали особенности антителиогенеза у карпа после предварительного содержания их в растворе фенола, т. е. на рыбах, подвергнутых хронической интоксикации. Опыты ставили на сеголетках карпа, подвергнутых воздействию фенолом в течение 1 мес при ежесуточной заданной концентрации 10 мг/л. Через месяц рыб двукратно иммунизировали путем внутрибрюшинных инъекций 150—220 млн. бактериальных тел *A. punctata*. Кровь брали через 45 сут после иммунизации. Во втором варианте опытов, как и в первом, получены сходные данные (рис. 31). Интенсивность

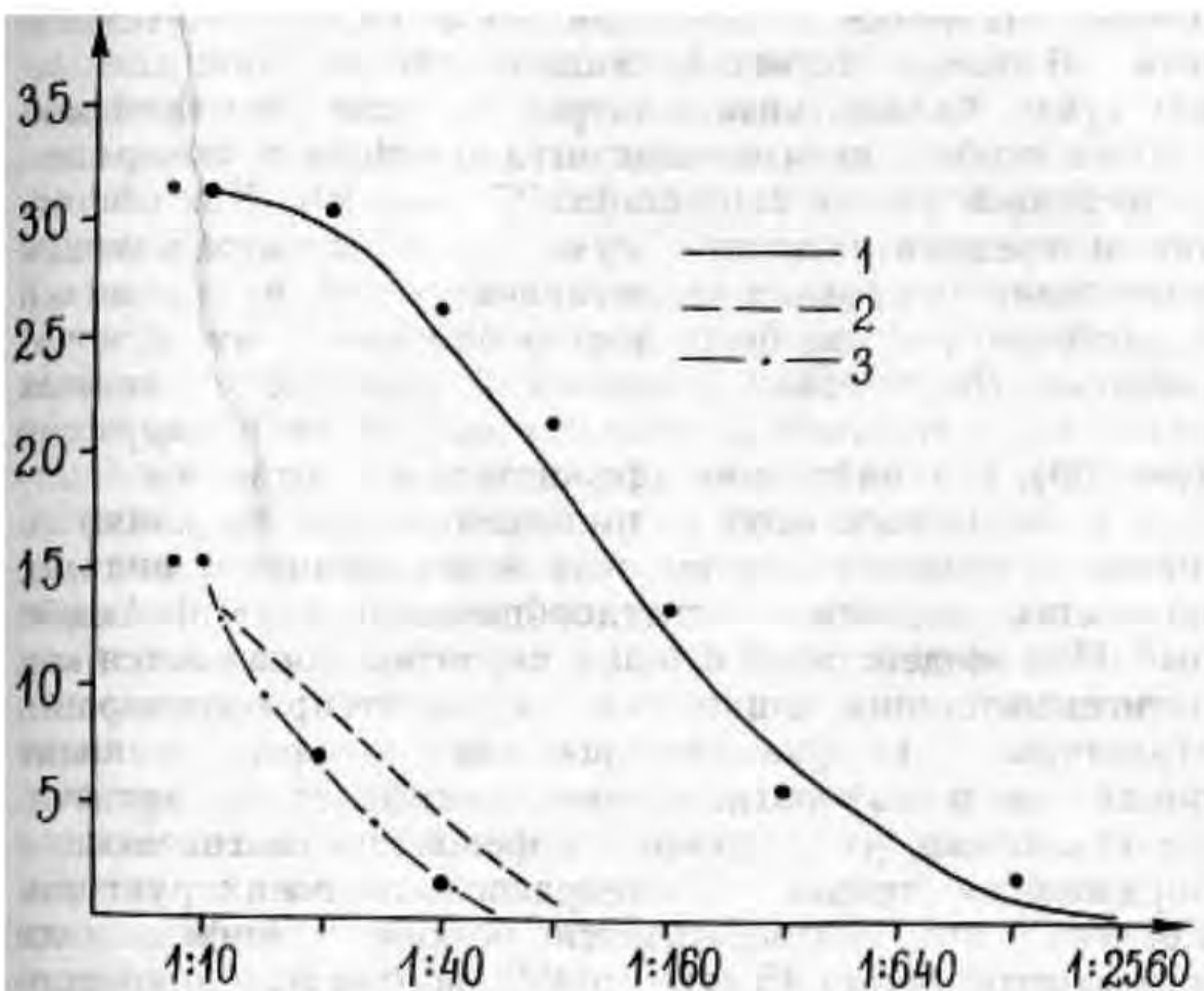


Рис. 30. Интенсивность реагирования иммунных сывороток карпов, подвергнутых воздействию фенола в реакции агглютинации.

1 — реагирование сыворотки крови контрольных рыб, 2 — то же опытных рыб, выдержанных в растворе фенола 10 мг/л, 3 — то же 12.5 мг/л. По оси ординат — сумма баллов в реакции агглютинации, полученная в 20 опытах, по оси абсцисс — разведение сыворотки.

сумме баллов была достоверно ниже, чем у контрольных рыб. Максимальная сумма баллов обнаружена нами в разведении сыворотки 1:10. Однако у контрольных особей она оказалась более чем в 2 раза (32 условных единицы) выше, чем у опытных (15 усл. ед.). Опытные и контрольные рыбы отличались между собой и по величине титров антител. У первых максимальный титр антител равнялся 1:40, у вторых — 1:2560. Полученные данные свидетельствуют, что функция иммунной системы рыб, находящейся в течение 1 мес в растворе фенола при концентрации 10 мг/л, не восстанавливается.

Таким образом, отчетливое ингибирующее действие фенола на функционирование иммунной системы рыб установлено нами при заданных ежесуточных концентрациях 10 и 12.5 мг/л. Эффект действия фенола на антителообразование усиливается после предварительного содержания рыб в растворе токсиканта. Антитела, выявлен-

дениях сыворотки, видимо, следует относить к естественным. Об этом, в частности, свидетельствуют такие данные, как сумма баллов, низкие титры, большое число рефрактерных особей, не имеющих агглютининов в сыворотке, разведенной свыше 1:10 (табл. 27, рис. 30). Как общая, так и средняя величины суммы баллов, отражающие интенсивность реакции агглютинации у рыб, находящихся в растворе фенола, были достоверно ниже, чем у контрольных. Достоверных различий в уровне естественных антител у интактных и опытных особей не обнаружено (рис. 30), т. е. по степени аффинитета агглютинины опытных и интактных особей, по-видимому, не отличаются. Фенол в относительно высоких концентрациях, видимо, полностью подавляет антителообразовательную функцию рыб. Под воздействием фенола, вероятно, поражается как антигенвоспринимающая, так и антигенразрушающая структуры, от функционирования которых зависит появление в сыворотке крови специфических антител. Не исключено, что в условиях фенольной интоксикации поражаются только антигенраспознающие структуры. Косвенно это подтверждается резким падением доли лимфоцитов (через 45 сут) до 45% против 92% в контроле и нарастанием моноцитов, гранулоцитов и полиморфноядерных лейкоцитов до 16.31 и 7% против 3.3 и 2% соответственно (Микряков, Флеров, 1971). О снижении антигенреагирующих клеток свидетельствуют данные исследований влияния низких значений pH (табл. 13). Одновременно у этих рыб падает антигенразрушающая функция (Микряков и др., 1984). Подобно фенолу, иммунодепрессивное действие на рыб оказывали стронций-90 (Шлейфер, 1975, 1976, 1978; Шлейфер, Шеханова, 1975, 1977), соли тяжелых металлов (Ni, Zn, Cu, Hg, Cr, Cd) (Строганов, 1979; Roales, Perlmutter, 1975; Sarot, 1977; O'Neil, 1981), полихлоркампафен (Зимин, 1981). Степень влияния токсических веществ на антителообразовательную функцию рыб определяется временем экспозиции рыб в растворах токсиканта и их заданной концентрацией.

Следует отметить, что токсические вещества оказывают неблагоприятное действие на функционирование иммунной системы рыб. Иммунная система рыб, как и теплокровных животных и человека (Троицкий, 1965; Шубик, 1976) на воздействие неблагоприятных факторов среды реагирует изменением функциональной активности.

Проведенные исследования антителообразовательной

новы синтеза противомикробных антител, их специфичность и физико-химические свойства, зависимость антителогенеза от деятельности клеток ЛМС, от характера взаимодействия ИМК с антигеном, ряда экологических факторов. Установлено, что основным местом синтеза у карпа и карасей являются РЛТ почек, затем селезенки. Тогда как у других видов интенсивный синтез антител происходит либо в селезенке (гурами, окунь), либо в почках и селезенке (лососевые) (Smith et al., 1967; Anderson, 1974).

В основе антителообразовательной функции иммунной системы рыб лежат процессы трансформации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток в сторону антителообразующих. В процессе взаимодействия бактериального антигена с иммуноцитами в популяциях клеток ретикулолимфоидной ткани меняется соотношение между отдельными формами клеток. Синтезу антител в организме рыб предшествует повышение доли лимфоидных и плазматических клеток. Сходный с таковыми у высших позвоночных животных тип реакции иммунокомпетентных клеток, обнаруженный у рыб в процессе синтеза антител, свидетельствует о том, что процесс трансформации и дифференцировки иммуноцитов в сторону антителообразующих уже появляется в низших позвоночных. Интенсивность выхода антител в ток крови зависит от кратности иммунизации и интервалов между первичной и вторичной вакцинациями, а также от экологических условий. Выявленное различие нормальных и активно приобретенных антител к воздействию цистеина свидетельствует о существующих различиях между ними в физико-химических свойствах. Рыбы в ответ на парентеральное введение бактериального антигена синтезируют IgM-подобные антитела с константой седиментации 19S. Изучение особенностей взаимодействия антител с гомологичными и гетерологичными бактериями в перекрестной реакции агглютинации и восходящей хроматографии свидетельствует, что иммунизация у рыб стимулирует синтез специфических антител. Авидитет макроглобулиновых антител выше, чем нормальных.

Данные анализа интенсивности антителогенеза у рыб, находящихся в условиях голодной диеты, указывают, что деятельность антигенразрушающих и антителосин-



синтеза специфического белка (антитела). Низкий уровень антител карпов, находящихся в растворе фенола, свидетельствует о чувствительности иммунной системы к данному токсиканту.

Иммунная система высших (Шубик, 1976) и низших позвоночных в ответ на меняющиеся условия среды реагирует сходным образом. Но у рыб, в отличие от теплокровных животных, активность иммунной системы при прочих равных условиях зависит от температуры окружающей среды. Кроме того, рыбы при иммунизации синтезируют иммуноглобулины только одного класса — IgM, тогда как высшие позвоночные вырабатывают сначала IgM, затем IgG антитела, отличающиеся от первого молекулярной массой, константой седиментации, содержанием субъединиц, авидитетом, антигенными свойствами, биологическими функциями и т. д. Дивергенция антител на классы происходит на уровне двоякодышащих рыб австралийской *Neoceratodus forsteri* и африканской *Protopterus aethiopicus* разновидностей (Litman, 1976; Marghalonis, 1977), хотя и у большинства представителей рыб, как и у теплокровных животных, антитела по некоторым физико-химическим параметрам гетерогенны и близки к таковым у высших позвоночных.

## **Глава V. ВЛИЯНИЕ ИММУНИЗАЦИИ НА АКТИВНОСТЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ**

Исследованиями влияния различных способов вакцинации против вирусной формы краснухи или весенней вирусной виiremии (Гончаров, 1951, 1953; Сорвачев и др., 1962; Fijan et al., 1977; Fijan, 1984), аэромоза или бактериальной формы краснухи карпов (Микряков, 1964а; Гончаров, Микряков, 1972; Микряков, Трофимова, 1975; Schaperclaus, 1954, 1970, 1972, 1979), фурункулеза (Krantz et al., 1964; Klontz, Anderson, 1970; Anderson, 1974; Antipa, Amend, 1977; Cipriano, 1983), бактериальной болезни почек (Evelin, 1971; Paterson et al., 1981), болезни Хагермана или «красный рот» (Newman, Maingich, 1982), вирусной геморрагической септицемии лососевых (Kinkelinn, Bearzotti, 1981), инфекционного нек-

1981), вибриоза лососевых и угревых (Висманис и др., 1979; Anderson, 1974; Schreckenbach, 1974, 1979; Guppels et al., 1976; Groy, Amend, 1977; Gould et al., 1978; Egidius et al., 1982; Johnson et al., 1982; Rosenkvist-Jensen, 1982) показана возможность использования методов иммунизации в борьбе с болезнями рыб.

В настоящее время вакцинный способ регуляции функциональной активности иммунной системы рыб интенсивно разрабатывается и применяется в практике борьбы с различными болезнями в условиях искусственного выращивания рыб в ГДР, Канаде, США, Японии, Югославии, Франции, Норвегии, Швеции, Англии и т. д. (Бауер, 1983; Fijan, 1984; Ногп et al., 1984). Напряженность иммунитета вакцинированных особей, как это установлено в опытах выживаемости рыб после заражения их возбудителями болезней, нарастает. Но недостаточно изучено влияние вакцинации на функционирование отдельных факторов иммунитета. Между тем, знание этого вопроса имело бы определенное значение для понимания механизмов, обуславливающих повышение степени сопротивляемости иммунных рыб к заразным болезням.

В целях понимания факторов, способствующих повышению степени сопротивляемости рыб после вакцинации, нами проведено дифференцированное исследование антигенразрушающей функции клеточных и гуморальных факторов иммунитета на примере карпа и карася, иммунизированных возбудителями аэромоноза (Микряков, 1964а; Микряков и др., 1974; Микряков, Трофимова, 1975; Микряков, Балабанова, 1979).

### **Особенности фагоцитарной реакции лейкоцитов иммунных рыб**

Лейкоциты позвоночных животных выполняют весьма разнообразные функции, в т. ч. и защитные, направленные на разрушение антигена путем фагоцитоза. Впервые участие лейкоцитов в фагоцитозе чужеродных тел отмечено И. И. Мечниковым (1903, 1956) у золотой рыбки после введения в брюшную полость эритроцитов морской свинки. Затем исследования по изучению защитных функций лейкоцитов рыб были продолжены рядом отечественных и зарубежных исследователей (Заварзин, 1945; Пучков, 1957; Гончаров, 1966, 1971; Лукьяненко, Сукачева, 1974; Шлейфер, 1975, 1978; Waingeb, Waingeb, 1969; Finn, Nealson, 1971; Aytalion, Scharabani, 1975;

1987; Söveni, Kusuda, 1987). Большая часть работ, вплоть до 1970 г., была посвящена анализу состава лейкоцитов, участвующих в фагоцитозе разнообразных инородных тел, имеющих живую и неживую природу, влиянию температуры, голодания и антибиотиков на интенсивность проявления защитных функций этих клеток. Было показано, что фагоцитарная активность лейкоцитов зависит от функционального состояния организма, температуры окружающей среды и т. д. Исследования по влиянию иммунизации на фагоцитоз лейкоцитов рыб до 1964 г. не проводились. Первые опыты по изучению данного вопроса проведены в 1964 г. (Микряков, 1964б). Фагоцитарную реакцию лейкоцитов изучали *in vivo* в зависимости от кратности иммунизации, возраста и вида рыб (Микряков, 1964б; Микряков и др., 1974; Микряков, Балабанова, 1979).

Исследования показали, что у иммунных особей повышается фагоцитарная активность лейкоцитов, однако, стимулирующее действие вакцины определяется кратностью иммунизации (%):

Кратность иммунизации	$M \pm m$	Коэффициент вариации	Отклонения
Однократная	$55 \pm 4.0$	36	30—78
Двухкратная	$80 \pm 4.2$	23	51—100
Трехкратная	$92 \pm 3.0$	15	82—100
Контроль	$27 \pm 2.6$	38	15—69

В опытах, поставленных на годовиках карпа (по 10 рыб) через 40 сут после иммунизации установлено, что фагоцитарная активность лейкоцитов карпа, определенная через 30 мин после инъекции бактерий, была максимальной у трехкратно иммунизированных особей. Однократная иммунизация оказывает менее эффективное влияние на защитную функцию лейкоцитов, чем двух- и трехкратная. Повышение функциональной активности лейкоцитов у многократно иммунизированных рыб происходит за счет повышения доли рыб, имеющих высокие показатели фагоцитарной реакции. Об этом свидетельствуют данные анализа коэффициента вариации, который у трехкратно вакцинируемых карпов оказался в 2 раза ниже, чем у контрольных и однократно иммунизированных особей.

При прочих равных условиях функциональная актив-

растных и видовых особенностей рыб (табл. 28, 29).

Таблица 28

**Возрастная изменчивость фагоцитарной активности лейкоцитов  
двукратно иммунизированных карпов, %**

Возраст	Иммунные		Неиммунные	
	$M \pm m$	коэффициент вариации	$M \pm m$	коэффициент вариации
4 мес.	$39 \pm 2.2$	0.28	$19 \pm 2.4$	0.80
1+	$80 \pm 6.1$	0.23	$27 \pm 2.6$	0.61
2+	$74 \pm 6.0$	0.25	$48 \pm 4.5$	0.38
3+	$99 \pm 2.1$	0.07	$53 \pm 6.0$	0.37

Таблица 29

**Влияние двукратной иммунизации на фагоцитарную активность  
лейкоцитов рыб, %**

Категория рыб	Количество рыб в опыте	$M \pm m$	Коэффициент вариации
Иммунные Неиммунные	Карась		
	15 15	$98 \pm 2.0$ $76 \pm 3.3$	0.09 0.28
Иммунные Неиммунные	Карп		
	10 10	$74 \pm 6.0$ $48 \pm 4.5$	0.25 0.38

Относительное число фагоцитирующих лейкоцитов у 4-месячных карпов, определенное через 30 мин после введения микробов, было меньше, чем у одно-, двух-, трехлетних особей. С возрастом повышается число активных фагоцитов, защитная функция лейкоцитов, падает показатель изменчивости фагоцитарной активности лейкоцитов. Стимулирующий эффект вакцины, по-видимому, не зависит от возрастных особенностей рыб, поскольку интенсивность фагоцитарной реакции лейкоцитов после иммунизации у всех возрастных групп, по сравнению с неиммунными соответствующих возрастов, нарастает одинаково (табл. 28). Фагоцитарная активность лейкоцитов к бактериям *Aeromonas punctata* у исследуемых рыб, видимо, зависит от наличия в организме преадаптированных антигенраспознающих клеток, дающих начало антигенразрушающим структурам. С возрастом, вполне возможно, число преадаптированных антигенвоспринимающих клеток увеличивается и отражает особенности онтогенетического развития карпов, что обусловлено, видимо, самоиммунизацией рыб в естественных условиях

*A. punctata* (Афанасьев, 1979). Не исключено, что такой контакт рыб с этими микроорганизмами через кишечный тракт приводит к увеличению популяции антигенраспознающих лейкоцитов. Возможно существуют и другие пути самоиммунизации рыб в естественных условиях.

При исследовании особенностей разрушения парентерально введенных меченых по  $^{14}\text{C}$  бактерий и распределения их в тканях и органах у разных видов рыб показано, что микроорганизмы в организме карася и окуня разрушались интенсивнее, чем в организме карпа (см. гл. III). Естественно, возникает вопрос, имеется ли связь между фагоцитарной активностью лейкоцитов и видовыми особенностями рыб. С этой целью проведено сравнительное исследование на двух видах рыб, относящихся к одному семейству: на карпе и карасе. Изучение проведено путем сопоставления ранее полученных результатов на карпе (Микряков, 1964а) и карасе (Микряков, Балабанова, 1979).

Лейкоциты иммунных и неиммунных карасей принимали более активное участие в фагоцитозе бактерий, чем лейкоциты карпов (табл. 29). Относительное число лейкоцитов у карасей было на 24—28% выше, чем у карпов (табл. 29). Несмотря на это, лейкоциты исследуемых рыб на иммунизацию изменением фагоцитарной активности реагируют сходным образом. Высокий уровень фагоцитирующих лейкоцитов, обнаруженный у карасей, по сравнению с карпами, видимо, генетически детерминирован и отражает видовые особенности антигенразрушающей функции лейкоцитов.

Таким образом, иммунизация вызывает модификационные изменения в популяциях лейкоцитов, участвующих в фагоцитозе микробов, путем повышения доли фагоцитирующих клеток и их поглотительной активности. Сходные результаты по влиянию иммунизации бактериальным антигеном получены (Honda et al., 1985) при исследовании форели, (Гончаров, 1966, 1971) карпа, различных породных линий карпа и сазана (Лукьяненко, Сукачева, 1974). Иммуностимулирующее действие вакцины на бактерицидную активность лейкоцитов рыб носит специфический характер (Микряков, 1964б; Микряков и др., 1974). Об этом, в частности, свидетельствуют показатели фагоцитарной активности лейкоцитов, полученные на карпе через 15 мин после инъекции иммунизированным рыбам гомологичных *Aeromonas punctata* и гетерологичных *Pseu-*

гомологичных бактерий число фагоцитов равнялось в среднем 51%, то после введения гетерологичных — 19%.

У рыб, как и у высших позвоночных животных (Адо, 1961; Здродовский, 1969; Покровский и др., 1979), в процессе иммунизации повышается фагоцитарная активность лейкоцитов. Иммунизация оказывает сходное влияние и на защитную функцию лейкоцитов. Повышение фагоцитарной активности лейкоцитов происходит против антигенного раздражителя, который был использован для иммунизации. В то же время неизвестно, какие факторы определяют изменение защитной функции лейкоцитов. Можно предположить, что изменение функциональной активности лейкоцитов иммунных особей происходит за счет перестройки уровня обменных процессов, повышения активности каталитических ферментов и приобретения новых бактерицидных факторов. Существенную роль в усилении фагоцитарной активности лейкоцитов, по-видимому, играют специфические антитела, выполняющие функции нейтрализации, опсонизации бактериальных тел и т. д. Иными словами, повышение функциональной активности лейкоцитов и интенсивность их участия в фагоцитозе определяются комплексом факторов, вызванных иммунизацией исследуемых рыб.

### **Бактерицидные свойства сыворотки крови**

Сыворотка крови рыб, подобно сыворотке высших позвоночных животных и гемолимфе беспозвоночных, помимо транспортировки питательных веществ, продуктов метаболизма, поддержания коллоидно-осмотического давления, рН среды, ионного равновесия и т. д., выполняет широкий спектр защитных функций, направленных на поддержание биологического постоянства внутренней среды организма при нарушении гомеостаза патогенными организмами и продуктами их жизнедеятельности. Принято считать, что иммунологические свойства сыворотки крови рыб обусловлены присутствием лизоцима, комплемента, пропердина, интерферона (Лукьяненко, 1971, 1989; Вихман, 1976, 1978; Sigel et al., 1968; Fletcher, 1982; Anders, 1978, 1981). При изучении механизмов врожденного неспецифического иммунитета (комплемента, пропердина и лизоцима) у 24 видов рыб, объединенных в 19 родов, 8 семейств и 7 отрядов, В. И. Лукьяненко (1971) впервые показал, что величины исследуемых показателей у особей одного и того же вида сильно

40-кратной величины. Частота обнаружения лизоцима и пропердина у большинства исследуемых рыб колеблется в пределах 6—48%. Изучение 3 гуморальных факторов естественного иммунитета позволило установить неравномерность распределения и различный уровень активности каждого из них в сыворотке у неодинаковых по экологии и систематическому положению видов рыб. В целом неспецифические факторы иммунитета рыб по сравнению с таковыми у теплокровных животных, выявлены в гораздо более низких величинах (Лукьяненко, 1971, 1989). Эта закономерность, видимо, не является специфичной для всего класса этих позвоночных животных, поскольку рядом авторов получены несколько иные результаты по содержанию комплемента и лизоцизма (Cushing, 1945; Legler, Evans, 1967; Legler et al., 1967; Fänge et al., 1976; Fletcher, 1982). Активность комплемента у акул, белого осетра, панцирной щуки, веслоноса, ильной рыбы, канального сомика, карпа и золотого карася была выше, чем таковая у кроликов или морских свинок (Cushing, 1945; Legler, Evans, 1967; Legler et al., 1967). Исключение составляют круглоротые миноги, в сыворотке которых комплемент не выявлен. У 11 видов круглоротых и рыб впервые выявлена хитиназа, которая, видимо, выполняет функцию защиты от грибковых и паразитарных болезней (Fänge et al., 1976).

Активность неспецифических факторов иммунитета зависит от возраста, сезона года, иммунизации рыб (Владимиров, 1966, 1969; Лукьяненко, 1971; Sigel et al., 1968; Anders, 1978, 1981). Иммунизация форели и окуня вакциной из *Aeromonas punctata* стимулирует не только антителообразовательную функцию, но и синтез лизоцима (Владимиров, 1966; Лукьяненко, 1971). Однако стимулирующее действие вакцинации на активность лизоцима, по мнению В. И. Лукьяненко (1971), носит неопределенный характер. Содержание других факторов иммунитета — пропердина и комплемента, при иммунизации рыб не меняется.

Таким образом, иммунизация приводит к изменению функциональной активности не только клеточных факторов иммунитета, но и гуморальных. Однако характер влияния вакцинации на механизмы неспецифического иммунитета следует считать слабо изученным. Неизвестно, каким образом отражается вакцинация на антимикробных свойствах сыворотки крови в процессе иммуноло-

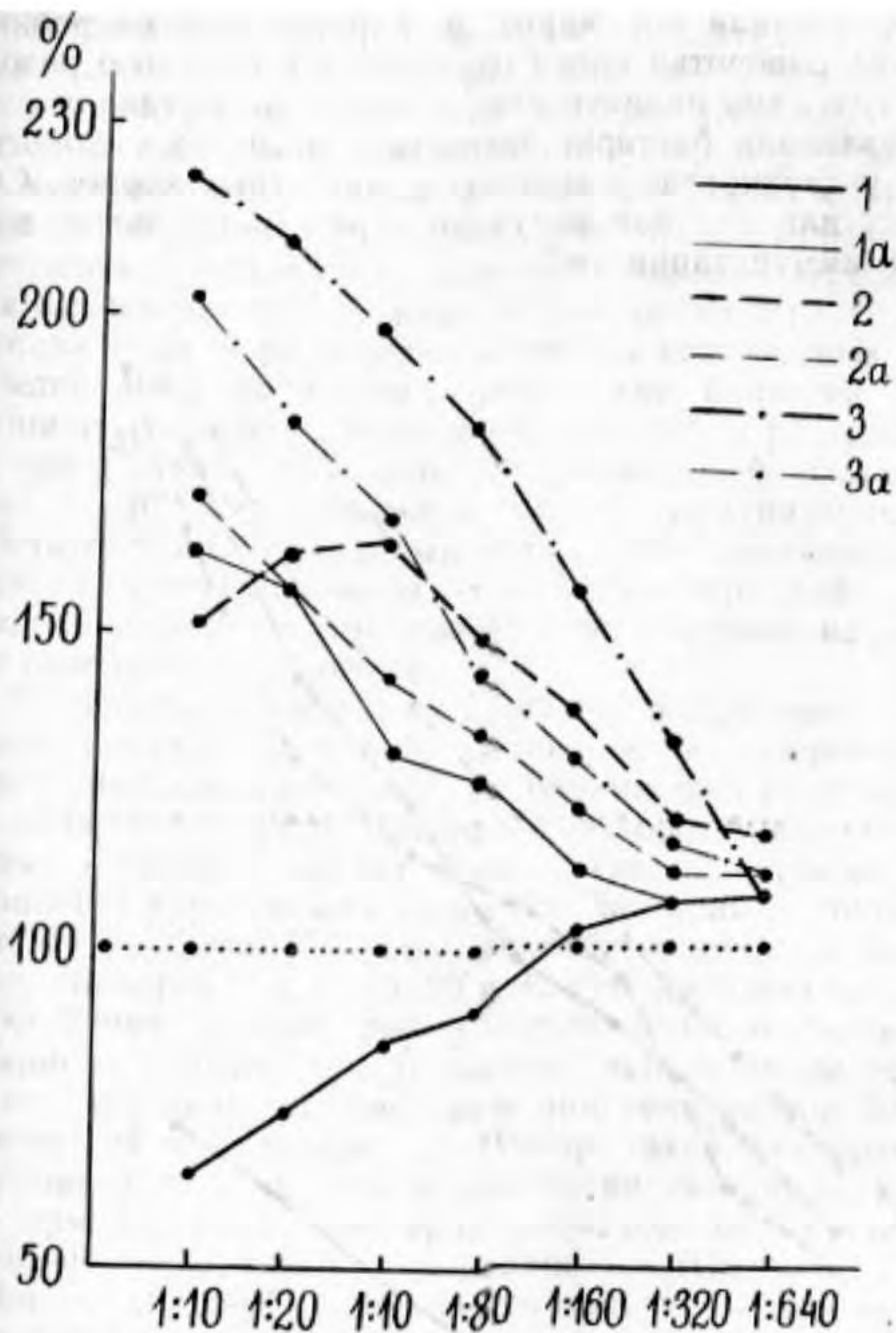


Рис. 31. Ассимиляция углекислоты гомологичной (1, 2, 3) и гетерологичной (1а, 2а, 3а) культурами бактерий в присутствии иммунной (1, 1а), нормальной (2, 2а) и инактивированной (3, 3а) сывороток.

По оси ординат — активность развития бактерий, %, по оси абсцисс — разведение сыворотки.

В целях выяснения особенностей влияния вакцинации на активность гуморальных факторов иммунитета нами проведено исследование бактерицидных свойств сыворотки крови у иммунных и неиммунных рыб (Микряков,



Опыты ставили на карпе и карасе. Антимикробные свойства сыворотки крови определяли с помощью разработанного нами радиоуглеродного метода. Предварительно сравнивали бактериостатические свойства сыворотки крови у двукратно иммунных и интактных карпов. Сыворотку для анализа получали через 40 сут после последней иммунизации рыб.

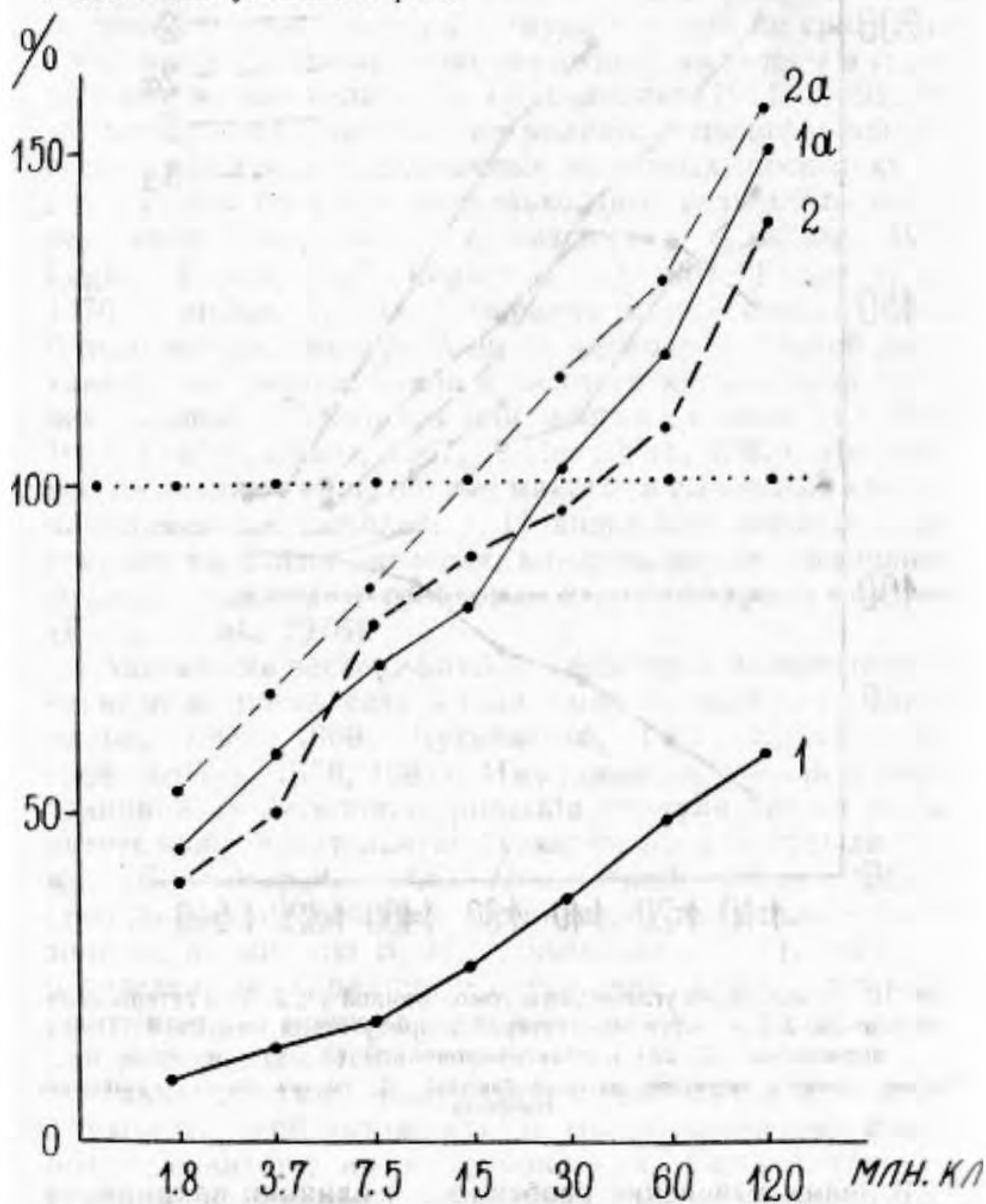


Рис. 32. Влияние иммунной (1, 2) и нормальной (1а, 2а) сывороток на развитие *Aeromonas punctata* (1, 1а) и *Pseudomonas fluorescens* (2, 2а).

Установлено, что исследуемый показатель у иммунных рыб оказался в 2—3 раза выше, чем у неиммунных. Интенсивность подавляющего действия иммунных сывороток на развитие бактерий *Aeromonas punctata* зависит от количества внесенных в опыт микробов и степени разведения сыворотки крови (рис. 31, 32). Наиболее интенсивное подавление жизнедеятельности тест-микробов происходит при разведении сыворотки 1:10. С повышением степени разведения величины исследуемых показателей снижаются. Неспецифические бактерии *Pseudomonas fluorescens* одинаково интенсивно развиваются в присутствии иммунной и неиммунной сывороток (рис. 31, 32). Это говорит о том, что иммунизация способствует появлению в сыворотке крови бактерицидных антител (бактериолизин по Л. А. Зильбер, 1958), обладающих специфическим угнетающим действием на развитие гомологичных бактерий.

В дополнительной серии опытов исследовали роль специфических бактериоагглютининов в интенсивности подавления жизнедеятельности тест-микробов *Aeromonas punctata*. В опытах использовали сыворотку крови двухлетних карасей и карпов. Рыб иммунизировали внутрибрюшинно вирулентным штаммом бактерий *A. punctata* (шт. 71) в дозе 500 млн. микробных тел. Сыворотку собирали через 1, 3, 5, 10, 30 и 40 сут. Антитела из сыворотки крови опытных рыб удаляли путем осаждения в реакции агглютинации. В опытах использовали также инактивированные нагреванием при температуре 50°C в течение 20 мин сыворотки. Выбор такой температуры обусловлен тем, что после обработки сыворотки крови рыб при указанном температурном режиме активность комплемента полностью подавляется (Cushing, 1942; Legler et al., 1967). Осаждение антител осуществляли с помощью инактивированных нагреванием тест-микробов *A. punctata* при разведении сыворотки 1:1. Для удаления агглютининов вносили 150—200 млн. микробных тел. Агглютинат отделяли через 24 ч центрифугированием при 10 тыс. об./мин в течение 15 мин. Сыворотку крови перед постановкой опытов разводили (РПБ) до отношения 1:5.

Показана различная степень участия специфических антител в защитных свойствах сыворотки крови рыб, которая зависит от стадии иммунологической перестройки организма и видовых особенностей рыб. В начальной

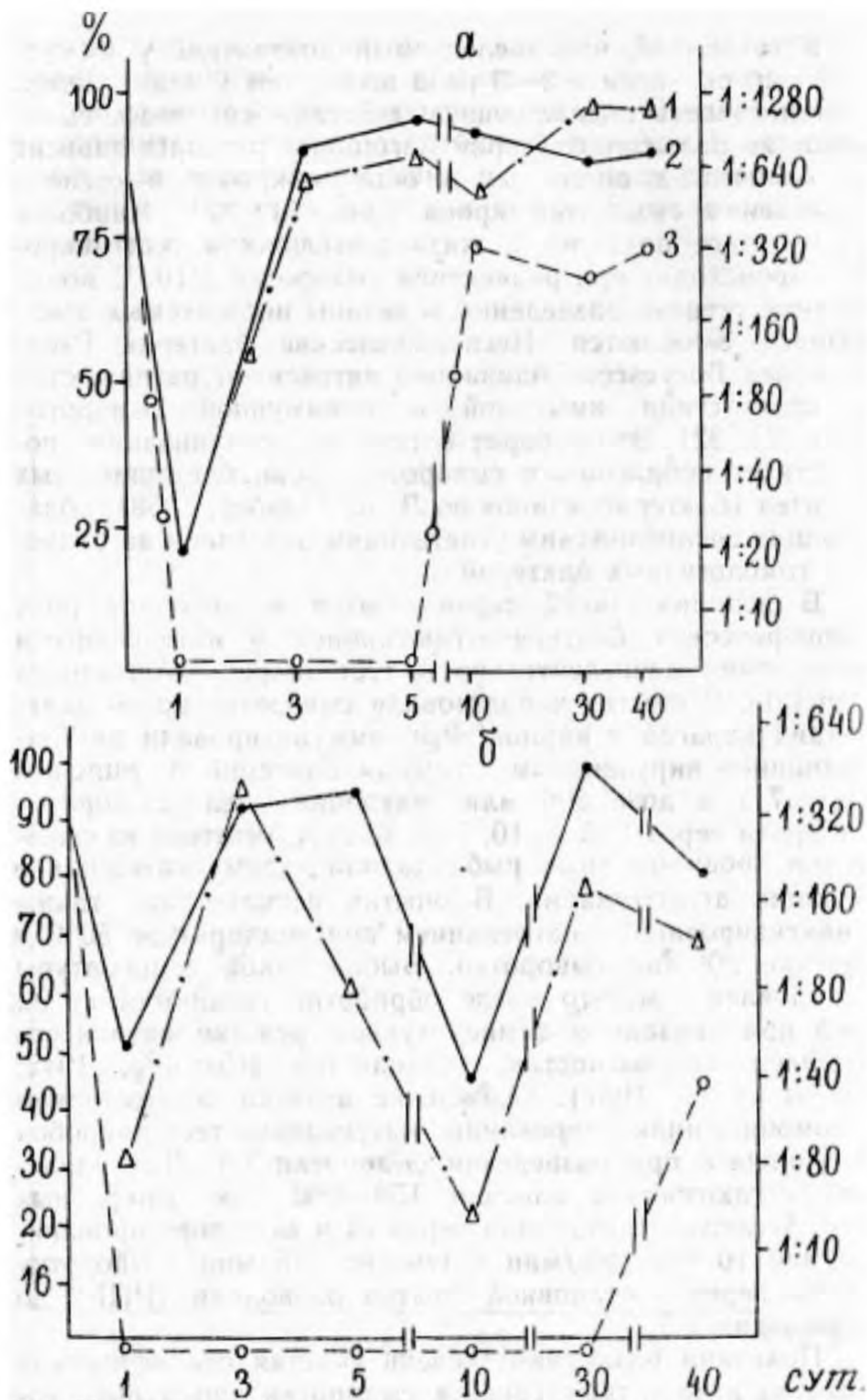


Рис. 33. Кинетика образования антител (1) и бактерицидные свойства сыворотки крови карпа (а) и карася (б) до (2) и после (3) удаления

сокая (1:10 и 1:40), показатели БАСК снижаются более чем в 4 раза у карпов и в 2 раза — у карасей (рис. 33, 34); по мере увеличения их титра активность гуморальных факторов иммунитета независимо от вида рыб нарастает. Способность сыворотки крови иммунизированного карпа подавлять жизнедеятельность бактерий, начиная с 3-х сут после иммунизации и до конца срока наблюдений, остается на высоком уровне (рис. 33), у карася эта функция колеблется и описывается двухвершинной кривой (рис. 34). Максимальная активность гуморальных факторов иммунитета у карасей обнаружена через 3, 5, 30 сут, минимальная — через 1 и 40 сут после иммунизации рыб. При сопоставлении активности защитных свойств сыворотки крови до и после осаждения антител установлена различная степень влияния их на развитие бактерий. Угнетающее действие сыворотки крови карасей на развитие микробов без антител во всех 100% случаев исчезает, за исключением сыворотки, полученной через 40 сут. БАСК карпов, определенная через 3 и 5 сут после иммунизации рыб, полностью зависела от наличия специфических антител. В дальнейшем, несмотря на довольно высокий уровень антител в крови (1:320—1:1280), степень влияния их на БАСК падает. Значение антител в сыворотках крови, полученных через 10, 30 и 40 сут, снижается до 25—30%.

Чтобы выяснить долю участия специфических антител в подавлении гетерологичных штаммов бактерий, мы определили степень влияния испытуемых сывороток на другие штаммы вирулентных микробов *A. punctata*.

Опыты ставили на 10 сыворотках крови, полученных через 5 сут после вакцинации карпов бактериями *A. punctata* (штамм 71) с титром антител 1:80—1:160. В качестве гетерологичного штамма использовали Кл7, выделенный от больных краснухой карпов. Существенных различий в развитии гетерологичного штамма *A. punctata* в присутствии иммунной сыворотки до и после удаления антител к гомологичному штамму не выявлено. БАСК по отношению Кл7 во всех случаях колебалась в пределах 16—17%, тогда как развитие гомологичного штамма бактерий в присутствии специфических антител подавлялось полностью. Естественные антитела, присутствующие в сыворотке крови интактных карпов, не угнетают развитие *A. punctata*. Оба штамма бактерий одинаково интенсивно угнетались в сыворотке крови как в присутствии есте-

не влияют на развитие гетерологичных штаммов бактерий.

При изучении температурной зависимости антимикробных свойств сыворотки крови показано, что защитная функция гуморальных факторов иммунитета у интактных карпов после нагревания при температуре 50°C в течение 20 мин полностью исчезает, тогда как у иммунных — существенно не меняется. Антимикробные свойства сыворотки крови иммунных рыб теряются после обработки сыворотки крови при температуре 65—70°C в течение 30 мин. Комплемент, вероятно, не оказывает заметного влияния на функционирование гуморальных факторов иммунитета у иммунных рыб.

Таким образом, иммунизация способствует повышению функциональной активности гуморальных факторов иммунитета. Ее повышение в основном происходит за счет специфических антител. Снижение антимикробных свойств сыворотки крови у иммунных рыб через сутки от момента иммунизации по отношению к гомологичным бактериям и в течение первых 5 сут по отношению к другому виду *Pseudomonas fluorescens* и штамму (Кл7) указывает на направленное изменение функциональной активности гуморальных механизмов иммунитета. Можно предположить, что организм рыб на первых этапах иммунологической перестройки становится чувствительным или восприимчивым к гетерологичной инфекции. Вакцинация рыб, как и высших позвоночных животных и человека (Иоффе, 1968), видимо, приводит к снижению напряженности естественного иммунитета к гетерологичной инфекции и инвазии. Хотя прямых наблюдений по этому вопросу мы не проводили, однако в опытах было замечено повышение зараженности у части иммунизированных рыб дактилогиридами. Вакцинация, видимо, оказывает сходное действие на функционирование гуморальных механизмов иммунитета позвоночных животных независимо от их систематического положения.

### **Сопротивляемость иммунных рыб к бактериальной инфекции**

При исследовании данного вопроса мы попытались выяснить специфичность и напряженность активного приобретенного иммунитета карпов к аэромоназу в зависимости от кратности иммунизации и вида вакцины (Микряков, 1964б; Микряков и др., 1974; Микряков,

В предварительных опытах, проведенных на однолетках карпа, иммунизированных трехкратно с 7-суточным интервалом внутрибрюшинными инъекциями против разных штаммов (123 и 111) возбудителей аэромоноза, показано, что вакцинация предохраняет опытных рыб от экспериментальной инфекции (табл. 30). Адаптивный иммунитет вырабатывается только против гомологичного штамма *Aeromonas punctata*, так как все 100% иммунных рыб после заражения их другим штаммом возбудителей аэромоноза погибают. Гибели рыб среди иммунных особей после заражения их гомологичным штаммом микробов в дозе, вызывающей 100%-ную гибель интактных рыб, не установлено.

Таблица 30

Сопrotивляемость иммунных рыб к разным штаммам *Aeromonas punctata*

Номер штамма, используемого для иммунизации рыб	Число рыб в опыте, экз.	Номер штамма, используемого для заражения	Число выживших рыб, %	Число погибших рыб, %
123	10	123	100	0
123	16	111	0	100
111	10	111	100	0
111	16	123	0	100

В другой серии опытов рыб иммунизировали вакциной из вирулентных и авирулентных штаммов *A. punctata* и *Escherichia coli communis*, получены те же результаты (табл. 31) (Микряков и др., 1974). Массовая гибель рыб, неиммунизированных и иммунизированных гетерологичными бактериями *Escherichia coli communis* (шт. 950), наблюдалась на 2—3-и сут, а иммунизированных авирулентной культурой *A. punctata* (шт. KB) — на 5—8-е сут. Гибель рыб наступала от общей септицемии. У выживших особей признаков септицемии не отмечено, за исключением незначительного снижения пищевого поведения и акта дефекации, которое быстро проходило.

В опытах, поставленных на двухлетках карпа, показано, что напряженность иммунитета, отражающая степень сопротивляемости к бактериальной инфекции у рыб, иммунизированных неослабленной вакциной, оказалась выше, чем инактивированной. Это было показано

## Влияние иммунизации вакциной из гомологичных и гетерологичных бактерий на устойчивость рыб к аэромонузу

Категория рыб	Число рыб в опыте	Титры антител	Число выживших рыб, %	Число погибших рыб, %
Иммунизированные штаммом 123	65	320—1280	82	18
Иммунизированные <i>Escherichia coli communis</i>	40	160—640	10	90
Иммунизированные авирулентным штаммом (KB)				
<i>Aeromonas punctata</i>	50	320—1280	14	86
Контрольные, неиммунизированные	59	10—40	10	90

Примечание. Иммунизация рыб осуществлена трехкратно с интервалом 5 сут, опыты поставлены на сеголетках карпа.

ции им различных доз вирулентных бактерий, вызывающих 100%-ную гибель интактных карпов. Количество выживших среди иммунизированных ослабленной вакциной рыб после введения им 1 дозы ЛД<sub>100</sub> равнялось 90% из 20 экз.; 3-х доз — 50% из 10 экз., 6 доз — 10% из 20 экз., тогда как соответствующие показатели среди иммунизированных живой вакциной равнялись соответственно 100, 80 и 50%. Отмеченные факты о более эффективном влиянии живой вакцины на функциональную активность иммунной системы рыб по сравнению с интактными наводит на мысль, что в процессе инактивации вирулентных бактерий путем нагревания, видимо, разрушаются антигенные детерминанты, усиливающие иммуногенность вакцин.

При повторном заражении выживших после первичной инокуляции иммунных особей устойчивость рыб к бактериальной инфекции повышается. Карпы приобретают стойкий иммунитет и становятся способными переносить 5—6-кратную летальную дозу. Активно приобретенный иммунитет у этих рыб сохраняется более одного года.

Таким образом, вакцинация является эффективным средством регуляции устойчивости рыб к заразным болезням. Данные наших опытов полностью согласуются с выводами других исследователей (Гончаров, 1951, 1953; Висманис и др., 1979; Krantz et al., 1964; Scharperclaus, 1954, 1972; Anderson, 1974; Schreckenbach,

1981; Sano et al., 1981; Cirriano, 1983) о том, что иммунизация повышает степень невосприимчивости рыб к инфекционным болезням. Эффективность вакцинации определяется качеством вакцины, а также кратностью вакцинации, которая была установлена нами в дополнительной серии опытов. Напряженность иммунитета у однократно иммунизированных рыб была равной 0.5 ЛД<sub>100</sub>, а у двукратных — 1.5 ЛД<sub>100</sub>.

Скорость иммунологической перестройки организма зависит также от метода воздействия на рыб вакцинным препаратом (Fijan, 1984; Hogn et al., 1984). Широко используемый в индустриально развитых странах метод групповой иммунизации, основанный на купании рыб в растворе вакцины, использовании явления гиперосмотической инфильтрации, кормления, обрызгивания рыб вакциной под давлением, отличается от парентерального (индивидуального) способа вакцинации более медленной перестройки механизмов иммунитета (Fijan, 1984; Hogn et al., 1984). Аналогичные выводы сделаны нами при исследовании реакции иммунной системы карпов при групповом и индивидуальных способах иммунизации карпов моновакциной против аэромоназа (Микряков и др. 1991).

Исследование влияния вакцинации на функционирование иммунной системы рыб позволило установить механизмы и факторы, лежащие в основе повышения степени сопротивляемости иммунных рыб к бактериальной инфекции.

Повышение напряженности активно приобретенного иммунитета у рыб связано с нарастанием количества антигенразрушающих клеточных и гуморальных структур и их функциональной активности. Об этом свидетельствуют и данные исследований фагоцитарной активности лейкоцитов и бактерицидных свойств сыворотки крови. Исследованиями показано, что изменение функциональной активности гуморальных механизмов иммунитета у иммунных рыб происходит за счет специфических антител. Влияние антител на БАСК на разных этапах иммуногенеза отличается и зависит от вида рыб. В период интенсивной иммунологической перестройки организма БАСК рыб полностью зависит от присутствия антител. После завершения процессов иммуногенеза влияние антител на БАСК падает. По-видимому, антитела в соответствии с периодом иммуногенеза выполняют ту или иную



ную и агглютинирующую функции, а в последнем — хелперную, связанную с осаждением бактерий. Не исключено, что у иммунных рыб первоначально вырабатываются только бактерицидные антитела. Возможно, антитела, вырабатываемые иммунной системой рыб, на разных этапах иммуногенеза выполняют различные биологические функции.

Эффективность стимулирующего действия вакцинации на функциональную активность иммунной системы зависит от кратности иммунизации и возраста рыб. Подтверждением этому следует считать результаты исследований фагоцитарной активности лейкоцитов, БАСК и выживаемости карпов после заражения их вирулентной культурой *Aeromonas punctata*. Показано, что с возрастом увеличивается число лейкоцитов, участвующих в фагоцитозе. Такие же изменения в функционировании клеточных факторов иммунитета вызывает многократная иммунизация. Однократная иммунизация является менее эффективной, чем двух- и трехкратная.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках единого методического подхода в книге рассмотрены закономерности функционирования иммунной системы рыб в процессе формирования активно приобретенного иммунитета от момента введения антигенного раздражителя до приобретения рыбами специфической устойчивости к инфекционному агенту.

На основе экспериментально обоснованных данных, сформулировано положение, что функционирование иммунной системы рыб после введения бактериального антигена подчиняется тем же закономерностям, что и высших позвоночных. В его основе лежат процессы распознавания, разрушения, элиминации антигенного раздражителя, трансформации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток в сторону антителобразующих, сопровождающиеся синтезом антител и появлением в популяциях иммуноцитов антигенраспознающих клеток. Разница заключается лишь в том, что у рыб, в отличие от теплокровных животных, активность реагирования иммунной системы при прочих равных условиях зависит от температуры воды. Сделан вывод, что распознавание бактерий осуществляют преддетерминированные лимфоциты. Уровень содержания АГРК в организме рыб определяется условиями содержания, степенью адаптированности иммунной системы к данному антигену. Иммунизация стимулирует образование АГРК *de novo*. У предварительно иммунизированных рыб увеличивается не только число АГРК, но и их функциональная активность. Это, вероятно, является одним из важных факторов, обуславливающих повышение функциональной активности иммунной системы предварительно иммунизированных рыб. У рыб, находящихся при низких температурах или подвергнутых воздействию низких значений рН, содержание этих клеток уменьшается. Обнаруженное различие в количестве АГРК у особей, содержащихся в благоприятных и неблагоприятных экологических условиях, позволяет считать, что популяция АГРК состоит из устойчивых и чувствительных к экстремальным воздействиям субпопуляций. Лимфоциты рыб по наличию антигенреагирующих рецепторов гетерогенны, а процесс реагирования их с чужеродными телами является  $Ca^{2+}$ - и  $Mg^{2+}$ -зависимым. Рыбы отличаются от теплокровных

жанию АГРК к ЭБ, КЗК и ЭБ+КЗК. В организме высших позвоночных животных АГРК с ЭБ, КЗК, ЭБ+КЗК обнаружено больше (около 50—70%), чем у рыб (около 2—14%), что, вероятно, отражает эволюционные отношения между ними и чужеродными телами. Из этого следует, что существующее различие в интенсивности иммуногенеза между высшими и низшими позвоночными определяется количеством преддетерминированных АГРК, содержащихся в организме этих животных. Лимфоциты рыб отличаются по характеру реагирования на митогены, специфичные для Т- и В-клеток высших позвоночных. Распределение лимфоцитов, аналогов Т- и В-клеток млекопитающих, у карпа отличается от других видов рыб, что, возможно, обусловлено поиском оптимального местонахождения Т- и В-клеток у низших позвоночных.

На основании анализа клеточной реакции иммуноцитов в ответ на парентеральное введение антигена выявлена прямая связь между динамикой появления функционально активных макрофагов и содержанием АГРК в очаге концентрации бактериальных тел у рыб. Появление индуцированных макрофагов зависит от патогенных свойств микроорганизмов, присутствия ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ .

Высказано предположение о том, что АГРК после адгезии бактерий на ее клеточной поверхности, в отличие от теплокровных животных (Покровский и др., 1979; Петров, 1982; Земсков, 1983), превращается в антигенразрушающую клетку, а интенсивность иммунного ответа определяется исходным количеством АГРК.

На основе анализа особенностей распределения меченых по  $^{14}C$  микроорганизмов в тканях и органах рыб и элиминации продуктов их распада из организма получены новые данные об антигенразрушающей функции иммунной системы пресноводных рыб. Сформулировано положение, что в основе иммунитета рыб к бактериальной инфекции лежат процессы гидролитического расщепления микроорганизмов антигенразрушающими структурами до конечных продуктов распада и их участие в обменных и иммунологических процессах. Парентерально введенные бактерии разрушаются до углекислоты и неидентифицированных органических веществ, выводимых из организма рыб через экскреторные пути: жабры, кожу, кишечный тракт и почки. Установлены общие для позвоночных животных и специфические для рыб зако-

в организме. Независимо от систематического положения животных, большая часть меченых микробов задерживается в органах и тканях, ответственных за иммунологическую перестройку; у рыб — в почках и селезенке, а у высших позвоночных — в лимфатических узлах, селезенке и печени. Обнаружено, что основная часть (60—70%) продуктов распада бактерий задерживается в организме рыб неопределенно долгое время и участвует в обменных процессах и синтезе антител.

Закономерности распределения бактериального антигена и интенсивность разрушения микроорганизмов определяются видовыми особенностями рыб, патогенными свойствами бактерий, температурой воды и функциональным состоянием РЭС. Иммунная система окуней функционирует интенсивнее, чем у карповых, а патогенные бактерии в организме рыб разрушаются медленнее, чем непатогенные. При низких температурах и после блокады РЭС тушью эти процессы подавляются, а у иммунных рыб, наоборот, повышаются. Установленная зависимость в распределении и разрушении бактерий в организме рыб от некоторых факторов среды свидетельствует о возможности регуляции антигенразрушающей функции иммунной системы путем коррекции условий среды, иммунизации и воздействия иммуномодулирующими средствами. Обнаруженное сходство в разрушении и распределении бактерий в организме рыб и теплокровных животных свидетельствует, что эти процессы в ряду позвоночных животных существенно не изменились.

Исследованиями морфологических основ синтеза антимикробных антител показано, что антитела у рыб синтезируются в органах, богатых ретикуло-лимфоидной тканью: почках и селезенке. В основе антителообразовательной функции лежат процессы трансформации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток в сторону антителообразующих. В процессе взаимодействия антигена с иммуноцитами в популяциях клеток ретикуло-лимфоидной ткани меняется соотношение между отдельными формами клеток. Выходу антител в ток крови предшествует повышение доли лимфоидных и плазматических клеток. При сопоставлении клеточных реакций рыб и теплокровных животных (Фонталин, 1967; Лебедев, 1971; Фриденштейн и Лурья, 1980) установлено сходство в характере реагирования ИМК на антигенный раздражитель у этих групп животных. Полученные данные дают осно-

вождающийся увеличением антителообразующих клеток в ответ на парентеральное введение антигена, обусловлен появлением в ряду позвоночных развитой лимфоидно-макрофагальной системы.

В книге анализируются физико-химические свойства и специфичность антител. На примере карпа показано, что антимикробные антитела относятся к меркаптоэтанол (2 МЭ), — или цистеин — чувствительным иммуноглобулинам, относящимся к IgM-подобным антителам высших позвоночных. Впервые установлено, что углерод бактерий, введенный в организм рыб в виде меченых по  $^{14}\text{C}$  *Aeromonas hydrophilla*, после метаболизма антигенразрушающими структурами включается в структуру антител и участвует в распознавании «чужого». При анализе интенсивности антителообразовательной функции клеток иммунной системы рыб; находящихся на голодной диете, в присутствии токсических веществ показано, что процессы антителогенеза подавляются. Аналогичное влияние на синтез антител оказывают низкие для оптимального роста и развития температуры. Выявленные закономерности интенсивности антителогенеза в зависимости от экологических условий среды важны для понимания факторов, обуславливающих появление в популяциях особей со вторичными иммунодефицитами и разработки вопросов регуляции процессов иммуногенеза путем коррекции условий среды обитания рыб.

Сформулировано положение, объясняющее повышение функциональной активности иммунной системы и напряженности активно приобретенного иммунитета рыб к бактериальной инфекции. Повышение функциональной активности иммунной системы рыб после иммунизации их бактериальным антигеном происходит за счет модификационной изменчивости клеточных и гуморальных факторов иммунитета. У иммунных рыб увеличивается содержание антигенреагирующих, антигенразрушающих и антителсинтезирующих клеток, возрастают показатели фагоцитарной активности лейкоцитов, бактерицидных свойств сыворотки крови и напряженности иммунитета. Степень повышения факторов иммунитета зависит от кратности иммунизации: 2- и 3-кратная иммунизация оказывает более эффективное влияние на иммунную систему, чем однократная. Анализ БАСК до и после удаления специфических антител позволил установить, что антимикробные свойства сыворотки крови повыша-

активность иммунной системы у иммунных особей увеличивается по отношению к гомологичным бактериям, используемым для иммунизации рыб. Сравнительное исследование клеточных и гуморальных факторов иммунитета у иммунных и неиммунных рыб дает основание полагать, что повышение степени сопротивляемости у предварительно иммунизированных рыб связано с морфо-физиологическими изменениями в иммунной системе. Эти изменения рассматриваются как пример адаптивной модификации по И. И. Шмальгаузену (1983), вызваны введением иммуногена и направлены на увеличение жизнеспособности (выживаемости) рыб в колеблющихся условиях среды обитания.

Таким образом, проведенные исследования позволили понять механизмы и факторы, лежащие в основе формирования приобретенного иммунитета рыб.

Установленные закономерности в функционировании иммунной системы могут быть использованы при разработке вопросов управления процессами иммуногенеза, механизмами специфического и неспецифического иммунитета путем вакцинации, введения иммуномодулирующих препаратов, коррекции условий среды обитания. Сформулированные в книге положения могут служить теоретической основой при создании вакцинных препаратов против бактериальных болезней рыб и осуществлении профилактических прививок в рыбоводных хозяйствах.

## ЛИТЕРАТУРА

### ЛИТЕРАТУРА

- Аветикян Б. Г. Об иммунологической реакции у рыб//Тр. совещ. по физиол. рыб. М., 1958.
- Аветикян Б. Г. Судьба чужеродного антигена в организме рыб// Экспериментальная и клиническая иммунология. Л., 1959.
- Адо А. Д. Патофизиология фагоцитов. М., 1961.
- Алмазов В. А. Лейкоциты//Физиология системы крови. Л., 1968.
- Аничков Н. Н. Учение о ретикуло-эндотелиальной системе. М.; Л., 1930.
- Афанасьев В. И. Аэромоноз рыб и меры борьбы с ним: Автореф. дис... докт. вет. наук. М., 1979.
- Балабанова Л. В. Влияние иммунизации на белковый состав сыворотки крови и экстрактов печени и почек карпа *Cyprinus carpio* (L.)//Биология и физиология пресноводных организмов. Л., 1971.
- Балабанова Л. В. Судьба парентерально введенных бактерий в организме рыб//Физиология и паразитология животных. Л., 1979.
- Балахни И. А., Гуньковский С. А., Давыдов О. Н., Заводчикова Н. С., Козиненко И. И., Стрилько Г. А., Темиханов Ю. Т. Динамика иммунологических показателей у карпов при воздействии метиленовым синим// Физиол. журн. 1989. № 4.
- Бауер О. Н. Экология паразитов пресноводных рыб (Взаимоотношения паразита со средой обитания)//Изв. ГосНИОРХ. 1959. Т. 49.
- Бауер О. Н. Инфекционные болезни лососевых в условиях искусственного выращивания (обобщение зарубежного опыта по этиологии, эпизоотологии, диагностике, профилактике и терапии за 1976—1982 гг.)//Рыбохозяйственное использование внутренних водоемов. 1983. Вып. 1.
- Бауер О. Н., Мусселиус В. А., Николаева В. М., Стрелков Ю. А. Ихтиопатология. М., 1977.
- Берг Л. С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. М.; Л., 1948.
- Берман В. М., Славская Е. М. О стимуляции неспецифической резистентности организма при помощи эндотоксина кишечной палочки//Современные проблемы иммунологии и иммунопатологии. М., 1970.
- Блюгер А. Ф., Векслер Х. М., Новицкий И. Н. Клиническая иммунология кишечных инфекций. Рига, 1980.
- Брондз Б. Д. Клеточные основы иммунологического распознавания. I. Соотношения и кооперативные связи между субпопуляциями Т и В-лимфоцитов в ходе первичного иммунологического распознавания//Успехи соврем. биол. 1977. Т. 84, вып. 2.
- Брондз Б. Д., Т-лимфоциты и их рецепторы в иммунологическом распознавании. М., 1987.
- Брондз Б. Д., Рохлин О. В. Молекулярные и клеточные основы иммунологического распознавания. М., 1978.
- Виноградов Г. А., Гдовский П. А., Матей В. Е. Закисление водоемов и его влияние на метаболизм у пресноводных животных//Физиология и паразитология пресноводных животных. Л., 1979.

- с внедрением лососевых рыб, выращиваемых в солоноватой воде// Морское рыбоводство. М., 1979.
- Вихман А. А. Система иммунитета рыб и ее противои инфекционная и противопаразитарная функции//Изв. ГосНИОРХ. 1976. Т. 105.
- Вихман А. А. Экологическая иммунология рыб на современном этапе//Успехи соврем. биол. 1983. Т. 95, вып. 1.
- Вихман А. А. Макромембранная гипотеза происхождения и эволюция иммунной системы низших позвоночных//Первый Всес. иммунол. съезд: Тез. докл. М., 1989. Т. 1.
- Вихман А. А., Генералова Л. П. Количество свободных клеток в органах систем иммунитета у карпа//VI Всес. совещ. по болезням и паразитам рыб. Тез. докл. М., 1974.
- Владимиров В. Л. Антителообразовательная функция у рыб и ее связь с гуморальными факторами естественного иммунитета — комплементом и лизоцимом//Симп. по паразитам и болезням рыб и водных беспозвоночных: Тез. докл. М.; Л., 1966.
- Владимиров В. Л. Иммунитет рыб при дактилогирозе//Проблемы паразитологии: Тез. докл. 2 научн. конф. УРНОП. Киев, 1967.
- Владимиров В. Л. Иммунитет рыб при дактилогирозе//Паразитология, 1971. Т. 5, вып. 1.
- Владимиров В. Л., Флеров Б. А. Восприимчивость к ихтиофтириозу у рыб при отравлениях фенолом и полихлорпиненом//VI Всес. совещ. по болезням и паразитам рыб. Тез. докл. М., 1974.
- Высокович В. К. О судьбе микроорганизмов, введенных в кровь теплокровных//Избранные труды. М., 1954 (1895).
- Галактионов В. Г. Иммунитет в эволюции многоклеточных животных//Успехи соврем. биол. 1982. Т. 93, вып. 1.
- Галактионов В. Г. Роль макрофагов в эволюции специфического иммунитета//Иммунология, 1983. № 1.
- Галактионов В. Г. Графические модели в иммунологии. М., 1986.
- Гинзбург-Калинина С. И. Некоторые вопросы механизма искусственно приобретенного иммунитета//Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунол. 1961. № 9.
- Головина Н. А. Морфологический анализ клеток крови карпа в норме и при заболеваниях: Автореф. дис. канд. биол. наук. М., 1977.
- Головина Н. А., Морфология клеток карпа в норме//Тр. ВНИИ пруд. рыб. х-ва. 1979. Вып. 23.
- Головина Н. А., Тромбицкий И. Д. Гематология прудовых рыб. Кишинев, 1989.
- Гончаров Г. Д. Серологическая диагностика карпа как доказательство вирусной природы краснухи//Рыб. х-во. 1949. № 4.
- Гончаров Г. Д. К иммунизации рыб//ДАН СССР. 1951. № 3.
- Гончаров Г. Д. Краснуха леща и других промысловых рыб//Рыб. х-во. 1953. № 6.
- Гончаров Г. Д. Иммунологическая реактивность у рыб//Бюл. Ин-та биол. водоохр. М.; Л., 1962. № 12.
- Гончаров Г. Д. Фагоцитоз карпа при бактериальном инфицировании//Биология рыб волжских водохранилищ. М.; Л., 1966.
- Гончаров Г. Д. Изучение механизма иммунитета рыб к инфекции//Обмен веществ и биохимия рыб. М., 1967.



- Гончаров Г. Д. Лабораторная диагностика болезней рыб. М., 1973.
- Гончаров Г. Д., Микряков В. Р. Влияние малых концентраций фенола на антителообразование у карпов//Всес. науч. конф. по вопросам водной токсикологии: Тез. докл. М., 1968а.
- Гончаров Г. Д., Микряков В. Р. О механизме действия антигена на клетки ретикуло-лимфоидной ткани рыб в процессе иммуногенеза//5 Всес. совещ. по эволюционной физиологии: Тез. докл. М.; Л., 1968б.
- (Гончаров Г. Д., Микряков В. Р.) Gontcharov G. D., Mikryakov V. R. Etude des facteurs de l'immunité des poissons a une infection bacterienne. Bull., off. int. Epiz. 1968b, Vol. 69, N 9—10.
- Гончаров Г. Д., Микряков В. Р. Влияние малых концентраций фенола на антителообразование у карпа (*Cyprinus carpio* L.)//Вопросы водной токсикологии. М., 1970.
- Гончаров Г. Д., Микряков В. Р., Владимиров В. Л. Иммуитет у рыб//Паразиты и болезни рыб и водных беспозвоночных. М., 1972.
- Гончаров Г. Д., Романенко В. И., Микряков В. Р. Изучение механизма иммунитета при помощи  $^{14}\text{C}$ //ДАН СССР. 1966. Т. 171, № 5.
- Гриневич Ю. А. Структура и функция клеток, образующих антитела: Обзор литературы//Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. 1973. № 5.
- Гришина Т. И., Мюллер С. Одновременное выявление Т, В и Д розеткообразующих лимфоцитов и нулевых клеток человека//Бюл. экспериментальной биологии и медицины. 1978. № 4.
- Губина Е. А. О практической ценности реакции агглютинации по методу Кастронода для диагностики бруцеллеза//Лабор. дело, 1964. № 1.
- Гурвич А. Е.  $\beta_2$ -микроглобулин и иммуноглобулины//Успехи соврем. биол. 1978. Т. 85, вып. 2.
- Гурвич А. Е., Незлин Р. С. Номенклатура иммуноглобулинов человека//Биохимия. 1965. Т. 30, вып. 2.
- Гурвич Г. А., Шумакова Г. В. Применение изотопного метода для изучения распределения антигена в лимфоидной ткани//Вопросы инфекционной патологии и иммунологии. М., 1963. Вып. 3.
- Давыдов В. Г. Реакция тканей хозяина при разных способах прикрепления некоторых цестод//Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1977, № 33.
- Давыдов В. Г. Сравнительная морфофункциональная характеристика некоторых систем органов цестод отряда Pseudophyllidea: Автореф. дис... канд. биол. наук. Л., 1981.
- Евгеньева Т. П. Межклеточные взаимодействия и их роль в эволюции. М., 1976.
- Евгеньева Т. П. Клеточные поверхности в онто- и филогенезе//Успехи соврем. биол. 1977. Т. 84, вып. 2(5).
- Епифанова О. И., Терских В. В., Захаров А. Ф. Радиоавтография. М., 1977.
- Жуков-Вережников Н. Н. Антигены//Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней. М., 1964. Т. 3: Основы иммунологии.
- Заварзин А. А. Оценка эволюционной гистологии крови и со-

- Здоровский П. Ф. Проблемы инфекции иммунитета и аллергии. М., 1969.
- Земсков В. М. 100-летие фагоцитарной теории И. И. Мечникова и ее влияние на развитие современной иммунологии//Иммунология, 1983. № 1.
- Земсков В. М., Журавлева Н. В., Земсков А. М. Тахифилаксия//Успехи соврем. биол. 1977. Т. 83, вып. 1.
- Зильбер Л. А. Основы иммунологии. М., 1958.
- Зимин Н. Л. Иммунофизиологическое состояние карпов при действии полихлоркамфена//IV Всес. симп. по инфекционным болезням рыб: Тез. докл. М., 1981.
- Иванов В. И., Приселков М. М., Черняховер С. И., Лесняк С. В. Распределение меченых антигенов в организме животных//Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. 1954. № 11.
- Иванова Н. Т. Атлас клеток крови рыб. М., 1983.
- Иоффе В. И. Клиническая и эпидемиологическая иммунология. Л., 1968.
- Канаев А. И. Ветеринарная санитария в рыбоводстве. М., 1973.
- Коган В. А. Биохимические свойства и факторы патогенности возбудителя аэромоноза (краснухи) рыб//Организация мероприятий по борьбе с инфекционными болезнями рыб: Тез. докл. М., 1981.
- Коробков А. В., Башкиров А. А., Ветчинкина К. Т. Нормальная физиология. М., 1980.
- Кудрявцев А. А., Кудрявцева А. А. Клиническая гематология животных. М., 1974.
- Кяйвярайнен А. И., Незлин Р. С. Структура иммуноглобулинов//Имуногенез и клеточная дифференцировка. М., 1978.
- Лебедев К. А. Морфологические аспекты дифференцировки антителопродуцирующих клеток: Автореф... дис. докт. мед. наук. М., 1971.
- Лебедев К. А., Каулен Д. Р., Ноева Н. А., Зайцева С. Ю., Прохоров В. Я., Шибанова Е. М., Хоробрых В. В. Изменение спонтанного розеткообразования под влиянием короткой инкубации лимфоцитов с антигеном//Иммунология, 1980. № 2.
- Лобунцов К. А. Иммунобиологическая реактивность рыб//I Всес. совещ. по инфекционным болезням рыб: Тез. докл. М., 1972.
- Лобунцов К. А. Краснуха и «краснухоподобные болезни» рыб (этиология и дифференциальная диагностика)//Новые методы и опыт оздоровления рыбохозяйственных водоемов от заразных болезней рыб: Тез. докл. М., 1974.
- Лобунцов К. А. Микрофлора больных аэромонозом карпов//Новые методы лечения инфекционных заболеваний рыб: Тез. докл. М., 1975.
- Лобунцов К. А., Юхименко Ю. П. К вопросу таксономии аэромонад, выделяемых от больных аэромонозом (краснухой) карпов//Организация мероприятий по борьбе с инфекционными болезнями рыб: Тез. докл. М., 1981.
- Лозовой В. П., Шергин С. М. Структурно-функциональная организация иммунной системы. Новосибирск, 1981.
- Лукьяненко В. И. Об особенностях антителообразовательной функции рыб//Научн. докл. Высш. школы. Биол. н. 1966. № 2.
- Лукьяненко В. И. Иммунобиология рыб. М., 1971.
- Лукьяненко В. И. Общая ихтиотоксикология. М., 1983.
- Лукьяненко В. И. Иммунобиология рыб. Возбудитель иммуни-

- Лукьяненко В. И., Свиридов Е. И. Иммунокомпетентные клетки рыб//ДАН СССР. 1967, Т. 177, № 5.
- Лукьяненко В. И., Сорокин Ю. И. Скорость поступления и распределения антигена в тканях рыб (*Rutilus rutilus* L.)//ДАН СССР. 1965, Т. 161, № 5.
- Лукьяненко В. И., Сукачева Г. А. Особенности антителогенеза и фагоцитоза у четырех генотипов карпа//VI Всес. совещ. по болезням и паразитам рыб: Тез. докл. М., 1974.
- Лукьяненко В. И., Сукачева Г. А., Попов А. В. Роль температурного фактора в определении интенсивного иммуногенеза у рыб//Научн. докл. Высш. школы. Биол. н. 1967, № 3.
- Лукьяненко В. И., Флеров Б. А. О токсикорезистентности сеголетков карася//Матер. по биол. и гидрол. водохранилищ. М., Л., 1963.
- Максимова Г. Д. Питание и пищевые взаимоотношения рыб Ивановского и Угличского водохранилищ//Рыбное хозяйство Калининской области. М., 1974.
- Малыревская А. Я. Обмен веществ у рыб в условиях антропогенного евтрофирования водоемов. Киев, 1979.
- Межнин Ф. И. Интерреналовая ткань и хромаффинная ткань пресноводных рыб//Вопр. ихтиологии. 1972, Т. 12, вып. 2.
- Межнин Ф. И. Интерреналовая и субперреналовая железы в онтогенезе белуги *Huso huso* (L.)//Биология, морфология и систематика водных организмов. Л., 1976.
- Метелев В. В., Канаев А. И., Дзасохова Н. Г. Водная токсикология. М., 1971.
- Мечников И. И. Невосприимчивость в инфекционных болезнях. СПб., 1903.
- Мечников И. И. Лекции о сравнительной патологии воспалений//Избранные произведения. М., 1956.
- Микряков В. Р. Иммунологическая реактивность и фагоцитарная активность у рыб//Матер. 18 научн. конф. студентов Ленингр. вет. ин-та. 1964а.
- Микряков В. Р. Иммунологическая реактивность при краснухе карпа//Сб. работ Ленингр. вет. ин-та. 1964б. Вып. 26.
- Микряков В. Р. Экспериментальные данные по распределению меченого <sup>51</sup>Cr антигена в организме рыб//Матер. 19 науч. конф. студентов Ленингр. вет. ин-та. 1965.
- Микряков В. Р. Применение радиоуглеродного метода для изучения иммунобиологических процессов в организме карпа//Симп. по паразитам и болезням рыб и водных беспозвоночных: Тез. докл. М., Л., 1966.
- Микряков В. Р. Динамика клеточных реакций в лимфоидной ткани почек карпа в процессе иммуногенеза//V Всес. совещ. по болезням рыб и водных беспозвоночных: Тез. докл. М., Л., 1968.
- Микряков В. Р. Влияние фенола на количество белка в сыворотке крови карпа в условиях хронического эксперимента//Физиология водных организмов и их роль в круговороте органического вещества. Л., 1969а.
- Микряков В. Р. Выживаемость карпов после иммунизации//Биология внутренних вод. Информ. бюл. Л., 1969б. № 3.
- Микряков В. Р. Выявление специфических иммуноглобулинов с помощью восходящей хроматографии//Биология внутренних вод. Информ. бюл. Л., 1970а. № 7.

- вой ткани при иммунизации//Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1970б. № 6.
- Микряков В. Р. Роль почек карпа в гомеостазе при бактериальном инфицировании//Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1970в. № 8.
- Микряков В. Р. О некоторых особенностях зараженности леща дельты Волги *Posthodiplostomum cuticula* в зависимости от иммунофизиологического состояния организма//Биологические продукционные процессы в бассейне Волги. М., Л., 1976.
- Микряков В. Р. Актуальные вопросы иммунологии рыб//Теоретические аспекты рыбохозяйственных исследований водохранилищ. Л., 1978.
- Микряков В. Р., Балабанова Л. В. Клеточные основы иммунитета рыб//Физиология и паразитология пресноводных организмов. Л., 1979.
- Микряков В. Р., Балабанова Л. В. Включение меченых  $^{14}\text{C}$  бактерий в структуру антител у рыб//Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1984. № 62.
- Микряков В. Р., Балабанова Л. В., Силкина Н. И. и др. В сб.: Функционирование иммунной системы рыб под воздействием биотических и абиотических факторов. ИБВВ АН СССР, Борок, Рук. деп. в ВИНТИ, 18.02.91. № 809—В91.
- Микряков В. Р., Виноградов Г. А., Клерман А. К., Силкина Н. И., Силкин Н. Ф. Влияние низких значений рН и углекислого газа на иммунофизиологическое состояние карпов//Физиологические и биохимические аспекты пресноводных животных//ИБВВ АН СССР, Борок, 1984. С. 229—242. Деп. в ВИНТИ, 23.02.1984. № 1637—84.
- Микряков В. Р., Володин В. М., Межнин Ф. И. Иммунофизиологическое состояние леща в период резорбции икры//Гидробиол. журн. 1976. Т. 12. № 3.
- Микряков В. Р., Гончаров Г. Д. Влияние малых концентраций фенола на антителообразование у карпов//Вопросы водной токсикологии. М., 1970.
- Микряков В. Р., Гончаров Г. Д., Романенко В. И., Трофимова Л. В. К изучению механизма иммунитета рыб//Флора, фауна и микроорганизмы Волги. Рыбинск, 1974.
- Микряков В. Р., Силкина Н. И., Силкин Н. Ф. Антимикробные свойства сыворотки крови рыб//Физиология и паразитология пресноводных организмов. Л., 1979.
- Микряков В. Р., Степанова В. М. Влияние Т- и В-митогенов на лимфоциты карпа//Организация мероприятий по борьбе с инфекционными болезнями рыб: Тез. докл. М., 1981.
- Микряков В. Р., Степанова В. М. Влияние митогенов на лимфоциты карпа (*Cyprinus carpio* L.)//Иммунология. 1983. С. 33—42. Деп. 18.10.83. № 5725—83.
- Микряков В. Р., Степанова В. М. Влияние температуры на антигенреагирующую функцию лимфоцитов карпа//VI Всес. конф. по экологической физиологии и биохимии рыб: Тез. докл. Вильнюс, 1985.
- Микряков В. Р., Трофимова Л. В. Иммунитет карпа к аэромонузу//Новые методы лечения инфекционных заболеваний рыб: Тез. докл. М., 1975.
- Микряков В. Р., Флеров Б. А. Распределение корпускулярного

- Микряков В. Р., Флеров Б. А. Картина крови карпа при хронической фенольной интоксикации//Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1971. № 9.
- Моисеев П. А., Азизова Н. А., Куранова И. И. Ихтиология М., 1981.
- Незлин Р. С. Строение и биосинтез антител. М., 1972.
- Неменова Ю. М. Методы лабораторных клинических исследований. М., 1972.
- Никольский Г. В. Теория динамики стада рыб. М., 1965.
- Никольский Г. В. Частная ихтиология. М., 1971.
- Петров Р. В. Иммунология. М., 1982.
- Петров Р. В., Михайлова А. А. Кооперация клеток при развитии гуморального иммунного ответа//Иммуногенез и клеточная дифференцировка. М., 1978.
- Петров Р. В., Хаитов Р. М., Атауллаханов Р. И. Иммуногенетика и искусственные антигены. М., 1983.
- Покровский В. И., Авербах М. М., Литвинов В. И., Рубцов М. В. Приобретенный иммунитет и инфекционный процесс. М., 1979.
- Покровская М. П., Краскина Н. А., Левенсон В. И., Гуторова Н. М., Брауде Н. И. Морфология и номенклатура иммунологически компетентных клеток лимфоидной ткани//Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1965. № 3.
- Прокопенко Л. Г., Равич-Щерба М. И. Обмен иммуноглобулинов. М., 1974.
- Пучков Н. В. О механизме фагоцитоза и влиянии некоторых факторов среды на фагоцитарную активность лейкоцитов в организме//Успехи соврем. биол. 1957. Т. 43, вып. 2.
- Романенко В. И. Гетеротрофная ассимиляция углекислоты как индикатор развития бактерий//ДАН СССР. 1966. Т. 168, № 1.
- Романенко В. И., Флеров Б. А. Методика определения элиминации антигена у рыб//Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1969. № 3.
- Рудиков Н. И., Грищенко Л. И. Микрофлора и бактериальные болезни рыб//Итоги науки и техники. Ихтиология. 1985. Т. 1.
- Румянцев Н. Н. О ретикуло-эндотелии и строении кроветворных органов некоторых видов костистых рыб//Арх. анатом., гистол. и эмбриол. 1939. Т. 21, № 2.
- Самойлина Н. Л. Морфологический метод оценки бластной трансформации лимфоцитов в культуре с фитогемагглютинином//Лабораторное дело. 1970. № 8.
- Сиротинин Н. Н. Эволюция иммунитета//Руковод. по микробиол. клинике и эпидемиол. инфекц. болезней. М., 1964. Т. 3: Основы иммунологии.
- Смирнова О. В., Кузьмина Т. Д. Определение бактерицидной активности сыворотки крови методом фотонейтриметрии//Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунолог. 1966. № 4.
- Сорвачев К. Ф., Задворочнов С. Ф., Исаев Ф. А. К вопросу об иммунизации рыб. Биохимия. 1962. Т. 27, вып. 2.
- Сорокин Ю. И. Методика определения карбонатов и свободной углекислоты и органического углерода в грунтах//Бюл. Ин-та биол. водохр. М.; Л., 1959. № 5.
- Строганов Н. С. Экологическая физиология рыб. М., 1962. Ч. 1.
- Строганов Н. С. Теоретические вопросы экологической физиологии рыб в связи с усилением токсичности водной среды//Современ-

- Тец В. И. Некоторые особенности иммунологической реактивности рыб//ДАН СССР. 1964. Т. 159. № 1.
- Троицкий В. Л. Радиационная иммунология. М., 1965.
- Трофимова Л. В., Микряков В. Р. Функционирование иммунологической системы карасей при разной температуре//Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1973. № 19.
- Трофимова Л. В., Микряков В. Р. О судьбе бактерий *Aeromonas punctata* в организме рыб//Научн. докл. Высш. школы. Биол. н. 1978. № 4.
- Трофимова Л. В., Микряков В. Р., Романенко В. И. Выделение продуктов распада бактерий из организма карасей при блокировании РЭС тушью//Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1973. № 18.
- Трофимова Л. В., Микряков В. Р., Романенко В. И. Распределение бактерий в органах и тканях рыб и выведения продуктов их распада//Гидробиол. журн. 1978. Т. 14, № 4.
- Ундрицов М. И. Распределение дизентерийного антигена в организме собак//Вопросы патологической физиологии инфекционного процесса. М., 1962.
- Учитель И. Я. Применение метода радиоактивных индикаторов в иммунологии//Успехи соврем. биол. 1957. Т. 43, вып. 2.
- Флеров Б. А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. Л., 1989.
- Флеров Б. А., Микряков В. Р., Куперман Б. И. Инвазионные и инфекционные процессы у рыб при токсическом воздействии//Гельминты в пресноводных биоценозах. М., 1982.
- Флеров Б. А., Романенко В. И. Исследование элиминации корпускулярного антигена у рыб//Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1969. № 3.
- Флеров Б. А., Романенко В. И. Сравнительное изучение выведения меченого  $^{14}\text{C}$  антигена у некоторых холоднокровных и теплокровных животных//Гидробиол. журн. 1970. Т. 4, № 2.
- Фонталин Л. Н. Иммунологическая реактивность лимфоидных органов и клеток. Л., 1967.
- Фонталин Л. Н., Певницкий Л. А. Иммунологическая толерантность. М., 1978.
- Фриденштейн А. Я. Лимфоидная ткань как орган иммунитета//Актуальные вопросы иммунологии. М., 1964.
- Фриденштейн А. Я., Лурья Е. А. Микроокружение лимфоидных органов как фактор иммунитета//Имуногенез и клеточная дифференцировка. М., 1978.
- Фриденштейн А. Я., Лурья Е. А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. М., 1980.
- Фриденштейн А. Я., Чертков И. Л. Клеточные основы иммунитета. М., 1973.
- Хайтов Р. М., Атауллаханов Р. И. Мембранозависимые медиаторы, регулирующие метаболизм, пролиферацию и дифференцировку иммуноцитов//Итоги науки и техники. Иммунология. 1981. Т. 9.
- Халилов Ф. Х. Материалы по морфологии и гистохимии пищеварительной системы костистых рыб. Алма-Ата. 1969.
- Хамидов Д. Х., Нишанбаев К. Н. Сравнительное электронно-микроскопическое исследование лейкоцитов периферической крови позвоночных животных//Арх. анат., гистол. и эмбриол. 1975. Т. 69. № 7.

- ное раздражение: Автореф. дис... канд. биол. наук. Петрозаводск, 1974.
- Х у т о р н о й Л. М. Бактериальная флора белого амура (*Steponphagodon idella* Val.) в норме и патологии: Автореф. дис... канд. вет. наук. М., 1989.
- Ч е р н о х в о с т о в а Е. В. О методике дифференцирования макроглобулиновых (19S) и  $\gamma$ -глобулиновых (7S) антител//Лабораторное дело. 1974. № 6.
- Ш л е й ф е р Г. С. Фагоцитарная активность лейкоцитов крови карпов, обитающих в растворах стронция-90. Всес. совещ. по новым методам лечения инфекционных заболеваний рыб: Тез. докл. М., 1975.
- Ш л е й ф е р Г. С. Влияние ионизирующей радиации на некоторые показатели иммунитета у рыб//Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1976. № 32.
- Ш л е й ф е р Г. С. Влияние ионизирующей радиации на иммунофизиологическое состояние рыб: Автореф. дис... канд. биол. наук. М., 1978.
- Ш л е й ф е р Г. С., Ш е х а н о в а И. А. Влияние ионизирующей радиации на антителообразование у рыб//Проблемы водной токсикологии. Петрозаводск, 1975.
- Ш л е й ф е р Г. С., Ш е х а н о в а И. А. Влияние ионизирующей радиации на некоторые факторы иммунитета у рыб//Радиоэкология животных. М., 1977.
- Ш м а л ь г а у з е н И. И. Пути и закономерности эволюционного процесса//Избранные труды. М., 1983.
- Ш у б и к В. М. Проблемы экологической иммунологии. М., 1976.
- A h n e W. Serological techniques currently used in fish virology//Dev. Biol. Standard 1981. Vol. 49.
- A m b r o s i u s H. Untersuchungen über die Immunoglobuline niederer Wirbeltiere//Allergie, Asthma, 1967, Bd 13 H. 2/3.
- A m b r o s i u s H. Phylogenetic aspects of Fish immunoglobulins and lymphocytes receptors//Immunol. a. immunization of Fish: Thes. Conf. Wageningen, 1981.
- A m b r o s i u s H. Comparative immunology as a research tool//Folia Biol (CSSR) 1985. Vol. 31, N 6.
- A m b r o s i u s H., F i e b i g H., S c h e r b a u m J. Phylogenetic aspects of fish immunoglobulins and lymphocyte receptors//Dev. comp. immunol. 1982. Suppl. 2.
- A m b r o s i u s H., R i c h t e r R., K o n i g J. Über die Immunoglobuline von Knochenfischen//Acta Biol. Med. Germ. 1967. Bd 19. H. 4.
- A m b r o s i u s H., S c h ä k e r W. Beiträge zur Immunobiologie poikilothermer Wirbeltiere. I. Immunobiologische Untersuchungen an Karpfen (*Cyprinus carpio* L.)//Zool. Jb. Physiol. 1964. Bd 71, H. 1.
- A n d e r s E. Erste Ergebnisse eines Versuch zu Selektion krankheits Widerstandsfähiger Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)//Wissenschaftliche konferenz zu Fragen der physiologie und Biologie von Nutzfischen. Rostock, 1978.
- A n d e r s E. Lysozimaktivitat bei Regenbogenforellen in Abhängigkeit vom Alter und Gesundheitszustang der Fische//Physiologie, Biologie und Parasitologie von Nutzfischen. Rostock, 1981.
- A n d e r s o n D. P. Fish immunology//Diseases of Fishes. Hong-

- Anderson D. P., Dixon O. W. Fish biologics: antisera for fish disease diagnosis//Fish. Pathogens and Environ. Eur. Polycult. Budapest, 1984.
- Anderson D. P., Dixon O. W., Robertson B. S. Kinetics of primary immune response in rainbow trout after flush exposure to *Yersinia ruckeri* O-antigen//Dev. Comp. Immunol. 1979. Vol. 3(4).
- Anderson D. P., Nelson J. R. Comparison of protection in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) inoculated with and fed Hagerman redmouth bacteria//J. Fish. Res. Board. Canada, 1974. Vol. 31, N 2.
- Anderson D. P., Robertson B. S., Dixon O. W. Cellular immune response in rainbow trout *Salmo Richardson* to *Yersinia ruckeri* O-antigen monitored by the passive haemolytic plaque assay test//J. Fish. Diseases, 1979. Vol. 2, N 3.
- Antipa R., Amend D. F. Immunisation of Pacific Salmon: Comparison of intraperitoneal injection and hyperosmotic infiltration of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* bacterins//J. Fish. Res. Board. Canada, 1977. Vol. 34, N 2.
- Avtalion R. R. Temperature effect on antibody production and immunological memory in carp immunized against bovine serum albumin (RSA)//Immunol. 1969. Vol. 17.
- Avtalion R. R. Environmental control of the immune response in fish//CRC Crit. Rev. Environ. Contr. 1981. Vol. 11, N 2.
- Avtalion R. R., Sharabani R. Studies on phagocytosis in fish. I. In vitro uptake and killing of living staphylococcus aureus by peripheral leucocytes of carp (*Cyprinus carpio* L.)//Immunol. 1975. Vol. 29.
- Azzolina L. S., Malesani V., Fontanarosa C., Tridante T. Erythrocyte agglutinins in the goldfish *Carassius carassius* var. *auratus*//Dev. comp. immunol. 1982. Suppl. 2.
- (Burnet F.) Бернет Ф. Клеточная иммунология. М., 1971.
- Busch R. A. Enteric red mouth disease (Hagerman strain)//Mar. Fish. Rev. 1978. Vol. 40, N 3.
- Busch R. A. The current status of diagnostic serology for the major bacterial diseases of Fishes//Dev. Biol. Standard. 1981. Vol. 49.
- Capra J. D., Wasserman R. L., Kehoe J. M. Phylogenetically associated residues within V<sub>H</sub>III subgroup of several mammalian species: Evidence for a "pauci-gene" basis for antibody diversity//J. Exp. Med. 1973. Vol. 138.
- Caspi R. R., Sharabani R., Avtalion R. R. The cells involved in the immune response of fish. I. The separation and study of lymphocyte sub-populations in carp — A new approach//Phylogeny Immunol. Amsterdam e. a., 1980.
- Chiller J. M., Hodgins H. O., Chambers V. S., Weiser R. S. Antibody response in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) I. Immunocompetent cells in the spleen and anterior kidney//J. Immunol. 1969. Vol. 102, N 5.
- Chiller J. M., Hodgins H. O., Weiser R. S. Antibody response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). 2. Studies on the kinetic development of antibody-producing cells and on complement and natural hemolysin//J. Immunol. 1969.



- Chushing J. E. An effect of temperature upon antibody-production in fish//J. Immunol. 1942, Vol. 45, N 1.
- Chung S., Secombes C. J. Activation of rainbow trout macrophages//J. Fish. Biol. 1987, Vol. 31, N 1.
- Cipriano R. C. Furunculosis: Pathogenecity, Mechanisms of Bacterial virulenco and the immunological response of Fish to *Aeromonas salmonicida*//Bacterial and viral diseases of Fish molecular studies. Washington, 1983.
- Cisar J. O., Fryer J. L. Characterisation of anti-*Aeromonas salmonicida* antibodies from coho salmon//Infect. Immunol. 1974, Vol. 9, N 2.
- Clem L. W., Lobb C. J., Faulmann E., Cichens M. A. Lymphocyte heterogenity in fish: differential environmental effects on cellular functions//Dev. biol. Standard. 1981, Vol. 49.
- Clem L. W., McLean W. E. Phylogeny of immunoglobulin structure and Function. VII. Monomeric and tetrameric immunoglobulins of the margate, a marine teleost fish//Immunol. 1967, Vol. 29.
- Clerx J. P. M., Castel A., Bol J. F., Gerwing G. J. Isolation and characterization of the immunoglobelin of pike (*Esox lucius* L.)//Veter. immunol. immunopathology. 1980, Vol. 1, N 2.
- Collins M. T., Dawe D. G., Gyratzek J. B. Immune response of channel catfish under different environmental conditions//J. Am. Vet. Med. Assoc. 1976, Vol. 169, N 9.
- Cooper E. L. Comparative immynology. New Jersey. 1976.
- Croy T. K., Amend D. F. Immunization of Sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using hyperosmotic infiltration//Aquaculture. 1977, Vol. 12.
- Cuchens M. A., Clemm L. W. Phylogeny of Lymphocyte Heterogenity. II. Differential effects of Temperature on Fish T-like and W-like Cells//Cellular immunol. 1977, Vol. 34, N 2.
- Cushing J. E. A comparative study of complement//J. immunol. 1945, Vol. 50, N 2.
- Dannevig B. H., Berg T. In vitro degradation of endocytosed protein in pronephros cells of the char (*Salmo alpinus* L.). The effects of temperature and inhibitors//Dev. comp. immunol. 1985, Vol. 9, N 2.
- Davies D. H., Lawson R. A serum precipitin from Atlantic salmon//Dev. comp. immunol. 1982, Suppl. 2.
- Dorson M. Same characteristics of antibodies in the primary response immune of Rainbow trout (*Salmo gairdneri*)//Diseases of Fish. L., N. Y., 1972.
- Dorson M. Vaccination trails of rainbow trout fry against infectious pancreatic necrosis//Bull. off. int. Epiz. 1977, Vol. 87.
- Dorson M. Role and characterization of fish antibody//Dev. biol. Standart. 1981, Vol. 49.
- Dorson M. Les proteins seriques jouant un role dans les reactions immunitaires ou apperentees chez poissons teleosteens//Ichthyophysiol. acta. 1983, Vol. 7.
- Egidius E. C., Andersen K., Clausen E., Kaa J. Bath vaccination against vibriosis//Dev. comp. immunol. 1982,

- Ellis A. E. The leucocytes of fish: a review//J. Fish. Biol. 1977, Vol. 11, N 5.
- Ellis A. E. Differences between the immune mechanisms of fish and higher vertebrates//Microbial diseases of fish. 1982.
- Ellis A. E., Parkhouse R. M. E. Surface immunoglobulins of the lymphocytes of skate, *Raja haevus*//Eur. j. immunol. 1975. Vol. 5.
- Emmrich F., Richter R. F., Ambrosius H. Immunoglobulin determinants on the surface of lymphoid cells of carps//Eur. J. Immunol. 1975. Vol. 5.
- Emmrich F., Richter R. F., Ambrosius H. Anti-idiotypic IgM antibodies produced in carp with BALB/c mouse myeloma protein S 117//Dev. comp. immunol. 1980. Vol. 4, N 2.
- Espelid S., Hjelmeland K., Jorgensen T. The specificity of Atlantic salmon antibodies made against the fish pathogen *Vibrio salmonicida*, establishing the surface protein VS-R1//Dev. comp. immunol. 1987. Vol. 11, N 3.
- Etlinger H. M., Hodgins H. O., Chiller J. M. Evolution of the lymphoid system. I. Evidence for lymphocyte heterogeneity in Rainbow trout revealed by the organ distribution of mitogenic responses//J. Immunol. 1976. Vol. 116.
- Etlinger H. M., Hodgins H. O., Chiller J. M. Evolution of the lymphoid system. III. Morphological and functional consequences of mitogenic stimulation of rainbow trout lymphocytes//Dev. comp. immunol. 1978. Vol. 2, N 2.
- Evelyn T. P. T. The agglutinin response in sockeye salmon vaccinated intraperitoneally with heat-killed preparation of the bacterium responsible for salmonid Kindey disease//J. Wildl. Dis. 1971. Vol. 7(4).
- Fänge R. Size relations of lymphomyeloid organs in some cartilaginous fish//Acta Zool. 1977. Vol. 58, N 3.
- Fänge R. A comparative study of lymphomyeloid tissue in fish//Dev. comp. immunol. 1982. Suppl. 2.
- Fänge R., Lundbad G., Lind J. Lysozyme and chitinase in blood and lymphomyeloid Tissues of marine Fish//Mar. biol. 1976. Vol. 36, N 3.
- Fergusson H. W. The ultrastructure of plaiceleucocytes//J. Fish. Biol. 1976. Vol. 8, N 1.
- Ferren F. A. Role of the spleen in the immune response of teleost and elasmobranchs//J. Florida Med. Ass. 1967. Vol. 54.
- Fiebig H., Scherbaum I., Ambrosius H. Immunohemical investigation of immunoglobulin-like cell surface protein of carp thymocytes //Molec. Immunol. 1979. Vol. 17.
- Fiebig H., Scherbaum Y., Ambrosius H. Evolutionärer Ursprung des I-lymphozyten-receptors. II. Herstellung und partielle Charakterisierung von Antiseren gegen das immunoglobulin-ähnliche Zellmembranprotein von Thymozyten des Karpfens//Acta biol. med. germ. 1980. Bd 39, H. 6.
- Fijan N. S. Vaccination of fish in european pond culture: prospects and constraints//Fish, Pathogens and Environ. Eur. Polycult. Budapest, 1984.
- Fijan N. S., Cvethić S. Imunitetna reaktivnost Sazana. I. Reaktivnost jednogodišnjih sazana kod 12-5°C u akvarijum

- Fijan N., Petrinc Z., Stanel Z., Kasic N., Teskeredzic E. Vaccination of carp against spring viremia: comparison of intraperitoneal and peroral applications of live virus to fish kept in ponds//Bull. off. int. Epiz. 1977. Vol. 87, N 56.
- Finc A., Drilhon A. Existence de globulines de faible mobilité électrophorétique dans le serum de L'Anguille soumise a des injections répétées de serum humain//Cons. report. Acad. Sci. 1961. Vol. 252.
- Finn J. P., Nielson N. O. Inflammatory response in rainbow trout//J. Fish. Biol. 1971. Vol. 3, N 4.
- Flemming H. Untersuchungen über die Blutweiskörper gesunder Bauchwassersuchtkranker Karpfen//Ztscher. Fischer. N. F. 1958, Bd 7, H. 1/2.
- Fletcher T. C. Non-specific defence mechanisms of fish//Dev. comp. immunol. Immunol. immunization of Fish. 1982. Suppl. 2.
- Folch I., Lees M., Sloan-Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal//J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226, N 4.
- Frommel D., Litman G. W., Finstad J., Cood R. A. The evolution of the immune response XI. The immunoglobulins of the horned shark, *Heterodontus francisci*: purification, Characterisation and Structural requirement for antibody activity//J. immunol. 1971. Vol. 106.
- Fujachara M. P., Nakatani R. E. Antibody production and immune response of rainbow trout and coho salmon to *Chondrococcus columnaris*//J. Fish. Res. Board. Canada. 1971. Vol. 20, N 9.
- Gally J. A. Structure of immunoglobulins//The Antigens N. Y., 1973. Vol. 1.
- Gosting L., Miranda D. M., Gould R. W. Antigen-binding cells in the peripheral blood of Sockeye Salmon, *Oncorhynchus nerka* Walbaum, induced by immersion or intraperitoneal injection of *Vibrio anguillarum* bacterium//J. Fish. Biol. 1981. Vol. 19, N 1.
- Gould R. W., O'Leary C. J. O., Garrison R. D., Rohovec J. S., Fryer J. D. Spray vaccination: A method for the immunization of Fish//Fish. Pathol. 1978. Vol. 13.
- Griffin B. R., Davis E. M. Myxosoma cerebralis: devection of circulating antibodies in infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*)//J. Fish. Res. Board Canada. 1978. Vol. 35, N 9.
- Gunnelis R. O., Hodgins H. O., Schiewe M. N. Failure of vaccines to protect salmon from vibriosis anzootic pugel Sound//J. Vet. Res. 1976. Vol. 37, N 6.
- Hädge D. Zur Evolution der Immunoglobuline//Allergie und Immunol. 1985. Bd 31, H. 4.
- Hädge D., Richter R. F., Ambrosius H. Strukturelle und immunochemische Untersuchungen and immunoglobulin des Karpfens (*Cyprinus carpio* L.) V. Tryptische Fragmente des immunoglobulins M des Karpfens (*Cyprinus carpio* L.)//Acta biol. med. germ. 1979. Bd 38, H. 8.
- Harris J. S., Cottrell B. J. Precipiting activity in the sera of plaice, (*Pleuronectes platessa* L.) to a helminth

Herraez M. P., Zapata A. Trapping of intraperitoneal-injected *Yersinia ruckeri* in the lymphoid organs of *Carassius auratus*: the role of melano-macrophage centres//J. Fish. Biol. 1987. Vol. 31, Suppl. A.

Hines R. I., Spira D. T. Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio* L. V. Acquired immunity///J. Fish. Biol. 1974. Vol. 6.

(Ночачка Р. В.) Хочачка П. В. Промежуточный обмен: сравнительные аспекты//Сравнительная физиология животных. М., 1977. Ч. 1.

Hodgins H. O., Weiser R. S., Ridway G. S. The nature of antibodies and the immune response in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)//J. Immunol. 1967. Vol. 99.

Honda A., Kodama H., Moustira M., Yamada F., Mikami T., Izawa H. Response of rainbow trout immunized with formalin-killed *Vibrio anguillarum*: activity of phagocytosis of fish macrophages and opsonizing effects of antibody//Fish. Pathol. 1985. Vol. 20, N 2—3.

Horne M. T., Tatner M. F., Ward P. D. Vaccination of fish: A practical view//Vet. Rec. 1984. Vol. 114, N 22.

Ingram G. A., Alexander J. B. The immunoglobulin of the brown trout (*Salmo trutta*) and its concentration in the serum of antigenstimulated and non-stimulated fish//J. fish. Biol. 1979. Vol. 14, N 3.

Ingram G. A., Alexander J. B. A comparison of the immune response of the brown trout (*Salmo trutta*) to a protein and a carbohydrate Antigen//Asp. Dev. comp. immunol. L., 1980.

Johnson R. A., Flynn J. R., Amend D. F. Onset of immunity in Salmonid fry vaccinated by direct immersion in *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins//J. Fish. Diseases. 1982. Vol. 5, N 3.

(Кэбот Е., Мейер М.) Кэбот Е., Мейер М. Экспериментальная иммунохимия. М., 1968.

Kawano K., Aoki T., Kitao T. Immersion vaccination and water-borne challenge of ayu (*Plecoglossus altivelis*) against vibriosis//Fish. Pathol. 1983. Vol. 18, N 3.

Kehoe Y. M., Capra Y. D. Phylogenetic aspects of immunoglobulin variable region diversity//Contemp. Topics Molecul Immunol. N. Y. 1974.

Kinkelin P., Gerard Y. P., Dorson M., Berre M. Viral Hemorrhagic septicemia: Demonstration of a protective immune response following Natural infection//Fish Health News. 1977. Vol. 6, N 1.

Kinkelin P., Bearzotti M. Immunization of rainbow trout against viral hemorrhagic septicemia (VHS) with a thermoresistant variant of the virus//Dev. Biol. Standart. 1981. Vol. 49.

Klontz G. W., Anderson D. P. Oral immunization of salmonids: a review//Diseases Fishes, Shellfishes. Washington, 1970.

Koshland M. E. Structure and function of the Y chain//Adv. immunol. 1975. Vol. 20.

Kraft I. A. Beitrage zur vergleichenden Histologie des Blutes und des Bindegewebes bei Knochenfischen//Zeitschr.

- Krantz G. E., Reddecliff J. M., Heist C. E. Immune response of trout to *Aeromonas salmonicida*. Part I. Development of agglutinating antibodies and protective immunity// *The Progressive Fish-Culturist*, 1964. Vol. 26, N 1.
- Kreutzmann H. Untersuchungen zur Morphologie des Blutes vom europäischen aal//*Folia Haematol.* 1977. Bd 104, H. 4.
- Krug S. Untersuchungen über die Antigenverwandtschaft von *Aeromonas punctata*-Stämmen//*Z. Binnenfischr. DDR.* 1979, Bd 26, H. 6.
- Lamers C. H. Y., Pilarczyk A. Immune response and antigen localization in carp (*Cyprinus carpio*) after administration of *Yersinia Ruckeri*-O-antigen//*Dev. comp. immunol.* 1982. Suppl. 2.
- Leeman M. G., Brindey W. A. Effect of toxic agents upon fish immune systems: a review//*Immunologic considerations in Toxicology*, 1981, vol. 6.
- Legler D. W., Evans E. A., Dupree H. K. Comparative immunology serum complement of Freshwater Fishes//*Trans. Amer. Fish. Soc.* 1967. Vol. 96, N 3.
- Legler D. W., Evans E. E. Comparative immunology. Hemolytic complement in Elasmobranchs//*Proc. Soc. exp. biol. med.* 1967. Vol. 124.
- Lewis D. H., Eurell T. E., Cannon M. S., Grumbles L. C. T u B cell analogues from peripheral blood of immune channel catfish, *Ictalurus punctatus*//*J. Fish. Biol.* 1979. Vol. 14, N 1.
- Linthicum D. S., Hildeman W. H. Immunologic response of Pacific hagfish. III. Serum antibodies to cellular antigen//*J. Immunol.* 1970. Vol. 105.
- Litman G. W. Physical Properties of immunoglobulins of lower species: A. Comparison with immunoglobulins of Mammals// *Comparative immunology*. Melbourne, 1976.
- Litman G. W., Frommel D., Finstad J., Good R. A. Evolution of the immune response. IX. Immunoglobulins of the bowfin. Purification and characterization//*J. Immunol.* 1971. Vol. 106.
- Litman G. W., Howe C. W. S., Cunningham-Rundles C., Oshman R., Gerberg-Jenson B., Kehoe J. M. Structural diversity of lower vertebrate immunoglobulin and related cell surface strictures//*Comparative immunology*. Amsterdam, 1976.
- Lopez D. M., Sigel M. M., Lee J. C. Phylogenetic studies on T cell. I. Lymphocytes of the shark with differential response to PHA and KonA//*Immunol.* 1974. Vol. 40.
- Machulla H. K., Richter R., Gruhn R., Ambrosius H. Untersuchungen Zeer Antikörperheterogenitat beim Karpfen (*Cyprinus carpio* L.). I. Elektrophoretische und isoelektrische Spektren von Anti-DNP-Antikörpern//*Acta biol. med. germ.* 1979. Bd 38, H. 9.
- Manning M. J., Crace M. F., Secombes C. J. Development aspects of immunity and tolerance in fish//*Microbial diseases of Fish. L.*, 1982.
- Marchalonis J. J. Lymphocyte surface immunoglobulins// *Science*. 1975. Vol. 190.
- Marchalonis J. J. Immunity in evolution. Cambridge, 1977.
- Marchalonis J. J., Cone P. E. The phylogenetic emergence

- Marchalonis J. J., Edelman C. M. Polypeptide chains of immunoglobulins from the smooth dogfish (*Mustelus canis*)// Science. 1965. Vol. 159, N 3756.
- Marchalonis J. J., Edelman G. H. Isolation and Characterisation of a haemagglutinating from *Limulus polyphemus*// J. Mol. Biol. 1966, Vol. 32, N 3.
- Marchalonis J. J., Schonfeld S. A. Polypeptide Chain structure of stingray immunoglobulin//Biochim. biophys. Acta. 1970. Vol. 221.
- Mattisson A. D. M., Fänge R. Light- and Electron-microscopic observations on the blood cells of the Atlantic hāg-fish, *Myxine glutinosa* (L.)//Acta Zool. (Stokh.). 1977. Vol. 58.
- McArthur C. P. Humoral antibody production by New Zealand eels, eels against the intestinal trematode *Telogaster opistorchis* Macfarlane//J. Fish. Diseases. 1978. Vol. 1, N 4.
- Meyers T. R., Serological and histopathological response of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson to experimental infection with the 13pz reovirus//J. Fish. Diseases. 1983. Vol. 6, N 2.
- Nakai J., Muroga K. Studies on red spot disease of pond-cultured cels-V. Immune response of the japanese eel to the causative bacterium *Pseudomonas anguilliseptica*//Bull. jap. Soc. Sci. Fish. 1979. Vol. 45, N 7.
- Neale N. G., Chavin W. Lymphocytes tissue alteration during the primary immune response of goldfish (*Carassius auratus*)// Mich. Academ. 1971. Vol. 3, N 4.
- Newman S. G., Mainarich J. J. Direct immersion vaccination of juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and juvenile Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) with a *Yersinia ruckeri* bacterin//J. Fish. Diseases. 1982. Vol. 5, N 4.
- Nishonoff A., Hopper J. E., Spring S. B. Idiotypic specificities in human monoclonal protein//The Antibody molecule. Chapter II. I. Y., L., 1975.
- Nybelin O. Über Agglutininbildung bei Fishen//Zschr. immunol. Forsch. 1934, Bd 84, H. 1.
- Nybelin O. The influence of temperature on the formation of agglutinings in fish//Bull. off. int. Epiz. 1968. Vol. 69, N 9—10.
- O'Leary P. S., Cisar S. O., Fryer J. L. The effect of temperature on agglutination activity of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) antiserum//J. Fish. Diseases. 1978. Vol. 1.
- Olivier G., Eaton C. A., Campbell N. Interaction between *Aeromonas salmonicida* and peritoneal macrophages brook (*Salvelinus fontinalis*)//Vet. Immunol. and Immunopathol. 1986. Vol. 12, N 1—4.
- O'Neill J. G. The humoral immune response of *Salmo trutta* (L.) and *Cyprinus carpio* (L.) exposed heavy metals//J. Fish. Biol. 1981. Vol. 19, N 3.
- Olson G. B. Non-specific and specific lymphoid blastogenesis in leukocyte cultures from *Polyodon spathula* and *Dasyatis americana*//Fed. Proc. 1967. Vol. 26.
- Ratneson W. D., Decantale D., Weber S. M. The immune

- agent of bacterial kidney disease. *Renibacterium salmoninarum*//J. Fish. Disease. 1981. Vol. 4, N 2.
- Paterson W. D., Lall S. P., Aisdrie D., Greer P., Greenham G., Poy M. Prevention of Disease in Salmonids by Vaccination and Diebary Modification//Fish Pathology. 1985. Vol. 20.
- Pontius H., Ambrosius H. Beitrage zur immunologie poikilothermer Wirbeltiere. IX. Untersuchungen zur zellulären Grundlage humoralen immunoreaktionen der Knochenfische em Beispiel der Fluscharsches (*Perca fluviatilis* L.)//Acta biol. med. Germ. 1972. Bd 29, H. 2/3.
- (Prosser K., Brawn F.) Проссер К., Браун Ф. Сравнительная физиология животных. М., 1989.
- Reinisch L., Litman W. Evolutionary immunobiology//Immunol. Today. 1969. Vol. 10, N 8.
- Richter R. F., Ambrosius H. Untersuchungen über die „Konkurrenz von antigenen“ bei Karpfen (*Cyprinus carpio* L.)//Acta biol. med. Germ. 1978. Bd 29, H. 6.
- Richter R. F., Emmrich F., Ambrosius H. Vergleichende Untersuchungen zur Spezifität von idiotypischen Meer-schweinchen — und Karpfen — Antiseren//Acta biol. med. Germ. 1980. Bd. 39, H. 2/3.
- Richter R. F., Frenzel E. M., Hädge D., Koppenschläger G., Ambrosius H. Strukturelle und immunochemische Untersuchungen and immunoglobulin des Karpfes (*Cyprinus carpio* L.) I. Analyse am gesamt-molekül//Acta biol. med. Germ. 1973. Bd 30, H. 6.
- Richter R. F., Broen J. M. How specific are carp antibodies//Dev. comp. immunol. 1984, Vol. 8, N 4.
- Riesen W., Rudikoff S., Oriol R., Potter M. An IgM Waldenström with specificity against phosphorilcholine//Biochemistry. 1975. Vol. 14.
- Rijkers G. T. Kinetics of humoral and cellular immune reactions in fish//Dev. compar. immunol. 1982, Suppl. 2.
- Rijkers G. T., Frederix-Wolters E. M. H., Van Muiswinkel W. B. The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibodyproducing cell in carp (*Cyprinus carpio*)//J. Immunol. 1980. Vol. 41, N 1.
- Rijkers G. T., Wiegelerinck, Van Oosterom, Van Muiswinkel W. B. Temperature dependence of humoral immunity in carp (*Cyprinus carpio*)//Asp. Dev. comp. immunol. Oxford, N. Y., 1981.
- Roales R. R., Perlmutter A. The immune response of the blue gourami. *Trichogaster trichopterus*//Trans. Amer. Fish. Soc. 1975. Vol. 104.
- Roales R. R., Perlmutter A. Methylmercury (cuper effects on hemosiderin. Possible mechanism of immune supression in Fish//Bull. Environ. Contam. and Toxicol. 1980. Vol. 24.
- Rosenkvist-Jonsen L. Results from vaccination of Danish rainbow trout against vibriosis//Dev. comp. immunol. 1982. Suppl. 2.
- Ruben N. Some aspects of the phylogeny of macrophage-lymphocyte immune regulation//Dev. comp. immunol. 1984. Vol. 8, N 2.
- Sano T., Tanaka K., Fukusaki S. Immune response in adult trout against formalin killed, concentrated IPNV//Dev.

Sarot D. A. Immune capabilities of the Zebra fish, *Brachydanio rerio*. 2. Effects sub-lethal doses of zinc on the immune response to viral and bacterial antigens. *Arch. Environ. Contam. and Toxicol.* 1977. Vol. 5, N 3.

Schachte J. H. Immunization of channel catfish *Ictalurus punctatus*, against two bacterial diseases//*Mar. Fish. Rev.* 178. Vol. 40, N 3.

Schaperclaus W. *Fischkrankheiten*. Berlin, 1954.

Schaperclaus W. Experimentelle Untersuchungen zur Ermittlung der wirksamsten in antigene für eine aktive Immunisierung von Karpfen gegen *Aeromonas punctata*//*Fischerei N. F.* 1970. Bd. 18, H. 3—4.

Schaperclaus W. Orale und paranterale aktive Immunisierung von Karpfen gegen *Aeromonas punctata*//*Arch. Exp. Veterinarmed.* 1972. Bd. 26, H. 5.

Schaperclaus W. *Fischkrankheiten*. Berlin, 1979.

Schreckenbach K. Immunoprophylaxe bei Fischen durch hyperosmotische Infiltration — von Impfstoffen//*Z. Binnenfisch. DDR.* 1979. Bd 26, N. 6.

Secombes C. J., Manning M. J. Comparative studies on the immune system of Fishes and amphibians: antigen localization in the carp *Cyprinus carpio* L.//*J. Fish. Diseases.* 1980. Vol. 3.

Seifter S., Dayton S., Novic B., Muntwyler E. The estimation of glycogen with the antrone reagent//*Arch. biochim. biophys.* 1950. Vol. 25, N 1.

Sigel M. M., Russel W. J., Jensen J., Beasley R. Natural immunity in marine fish//*Bull. Off. Int. Epiz.* 1968. Vol. 69, N 9—10.

Smith A. M., Potter M., Merchant E. P. Antibody forming cells in the pronephros of the teleost *Lepomis macrochirus*//*J. Immunol.* 1967. Vol. 99, N 5.

Smith P. D. Analysis of the hyperosmotic and bath methods for fish vaccination-comparison of uptake of particulate and non particulate antigens//*Dev. comp. immunol.* 1982. Suppl 2.

Smith W. Production of antibacterial agglutinins by carp and trout at 10°C//*Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 1940. Vol. 45.

Snieszko S. F. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes//*J. Fish. Biol.* 1974. Vol. 6, N 2.

Song Y. L., Chen S. N., Kon G. N. Agglutinating antibodies production and protection in eel (*Anguilla japonica*) inoculated with *Aeromonas hydrophila* (*A. liquefaciens*) antigens//*J. Fish. Soc. Taiwan.* 1976. Vol. 4.

Söveni J. F., Kusuda R. Kinetics of vitro phagocytosis by cells from head-kidney of common carp, *Cyprinus carpio* L.//*Fish. pathology.* 1987. Vol. 22, N 2.

Summerfelt R. C. Identification of a serum protein with antibody activity//*Bull. Wildl. Dis.* 1966. Vol. 2.

Tatner M. F., Johnson C. M., Horne M. T. The Tissue localization of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, following three methods of administration//*J. Fish. Biol.* 1984. Vol. 25, N 1.

(Тессенов В.) Тессенов В. Реакция blast-трансформации лимфоцитов селезенки под влиянием антигена in vitro//*Иммуноло-*



- Topf W. Die Blutbildung und die Blutbildungsstätten beim Karpfen (*Cyprinus carpio* L.)//Ztschr. Fisch. 1955. Bd 4, H. 3/4.
- Untu C. Sistemul reticulo-histocitar din sprina de *Cyprinus carpio* L.//Stud. i cerc. biol. 1974. Vol. 26, N 2.
- Van Muiswinkel W. B., Rijkers G. T., Van Oosterom R. The origin vertebrate immunity. The lymphoid system in fish//Proc. Zodiac Symp. Adaptation, Wageningen. 1978.
- Vitetta E., Uhr J. Cell surface immunoglobulin. V. Release from murine splenic lymphocytes//J. Exp. Med. 1972. Vol. 135, N 4.
- Warr G. W., De Luca D., Griffin B. R. Membrane immunoglobulin is present on thymic and splenic lymphocytes of the trout *Salmo gairdneri*//J. Immunol. 1979. Vol. 123.
- Warr G. W., De Luca D., Marchalonis J. J. Phylogenetic origin of immune recognition lymphocyte surface immunoglobulins in the gould-fish, *Carassius auratus*//Proc. natl. Acad. Sci. USA. 1976. Vol. 73.
- Warr G. W., De Luca D., Marchalonis J. J. Phylogeny and ontogeny of antigen-specific T cell receptors//Develop. and Differ. Vertebr. Lymphocytes: Proc. Symp. Durham, 1979. Amsterdam e. a., 1980.
- Warr G. W., De Luca D., Marchalonis J. J. Thymocyte plasma membrane of the rainbow trout *Salmo gairdneri*: associated immunoglobulin and heteroantigens// Comp. Biochem. Physiol. 1983. Vol. 76, N 3.
- Warr G. W., Marchalonis J. J. Membrane immunoglobulins of teleost Fish Lymphocytes//Immunol. a. immunizatyon of Fish: Theis Contser. Wageningen, 1981.
- Wasserman R. L., Kehoe J. M., Capra J. D. The V<sub>H</sub>III subgroup of immunoglobulin heavy chains: Phylogenetically associated residues several avian species//J. Immunol. 1974. Vol. 113.
- (Wedemeyer G. A., Meyer F. P., Smith L.) Ведемейер Г. А., Мейер Ф. П., Смит Л. Стресс и болезни рыб. М., 1981.
- Wrathwell A. B., Parish N. M. Cell surface receptors and immune mechanisms in an Elasmobranchs Fish *Scyliorhinus canicula*//Asp. Dev. comp. immunol. L., 1980.
- Yamaguchi N., Teshima C., Kurashide S., Sato T., Mitsuhashi S. Seasonal modulation antibody formation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)//Asp. Develop. comp. immunol. L., 1980.
- Yu M. L., Sarot D. A., Filazzola K. J., Perlmutter A. Effects of splenectomy on the immune response of the blue gourami *Triechnogaster trichopterus* to, infectious pancreatic Necrosis (IPN) virus//Life Sci. 1970. Vol. 9, N 2.
- Zapata A. Phylogeny of the fish immune system//Bull. de L. Inst. Pasteur. 1983. Vol. 81.
- Zeeman M. C., Brindley I. I. Effect of toxic agents upon fish immune systems: a review//Immunologic consideration in toxicology. 1981. Vol. 2.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение . . . . .	3
Глава I. Методы и объекты исследований . . . . .	5
Определение антигенраспознающей функции . . . . .	7
Изучение антигенразрушающей функции и метаболизма бактериального антигена в организме рыб . . . . .	11
Методы определения антител . . . . .	17
Исследование напряженности иммунитета . . . . .	20
Глава II. Распознавание и восприятие бактериального анти- гена . . . . .	21
Реакция лимфоидных клеток на антиген . . . . .	22
Морфофункциональная характеристика антиген-распознаю- щих клеток . . . . .	33
Влияние некоторых факторов на содержание антигенреа- гирующих клеток в организме рыб . . . . .	46
Особенности распределения и концентрации антигенраспо- знающих клеток в организме . . . . .	50
Глава III. Метаболизм бактериального антигена в организме рыб . . . . .	52
Разрушение бактерий и выведение продуктов их распада . . . . .	53
Распределение органического вещества микробов в тканях и органах . . . . .	59
Включение углерода бактерий в синтез антител . . . . .	67
Влияние различных факторов внешней среды на скорость метаболизма бактериального антигена в организме рыб . . . . .	69
Глава IV. Образование антител у рыб . . . . .	81
Морфологические основы и закономерности антителогене- за . . . . .	83
Физико-химические свойства и специфичность антител . . . . .	91
Влияние различных факторов среды на интенсивность ан- тителогенеза . . . . .	103
Глава V. Влияние иммунизации на активность иммунологи- ческих процессов . . . . .	112
Особенности фагоцитарной реакции лейкоцитов иммунных рыб . . . . .	113
Бактерицидные свойства сыворотки крови . . . . .	117
Сопrotивляемость иммунных рыб к бактериальной ин- фекции . . . . .	124
Заключение . . . . .	129
Литература . . . . .	134

## Contents

Introduction	3
Chapter I. Methods and objects of the study	5
Determination of the antigenrecognizing function	7
Investigation of the antigenprocessing function and metabolism of a bacterial antigen in fish organisms	11
Methods of antibodies determination	17
Investigation of immunity intensity	20
Chapter II. Recognition and perception of bacterial antigen	21
Response of lymphoid cells to antigen	22
Morphofunctional characteristic of antigenrecognizing cells	33
Effect of some factors on antigenresponding cells content in fish organism	46
Peculiarities of distribution and concentration of antigenrecognizing cells in organism	50
Chapter III. Metabolism of bacterial antigen in fish organism	52
Bacteria destruction and dissolution of the decay products	53
Distribution of microbe organic matter in tissues and organs	59
Participation of bacteria carbon in antibodies synthesis	67
Impact of various external factors on metabolism rate of bacterial antigen in fish organism	69
Chapter IV. Antibodies formation in fish	81
Morphological foundation and regularities of antibodygenesis	83
Physico-chemical properties and specificity of antibodies	91
Effect of various environmental factors on antibodygenesis intensity	103
Chapter V. Immunization effect on activity of immunological processes	112
Peculiarities of leucocytes phagocytic response of immune fishes	113
Bactericidal properties of blood serum	117
Resistance of immune fish to bacterial infection	124
Conclusion	129
List of references	134