

На правах рукописи

КАСАЕВА СВЕТЛАНА ЮРЬЕВНА

**ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-2
НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
ОСЕТРОВЫХ РЫБ**

Специальность 03 00 13 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Астрахань - 2007

**Работа выполнена в Научно-производственном центре по осетроводству
«БИОС»**

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор,
академик РАЕН
Теплый Давид Львович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Алтуфьев Юрий Владимирович

доктор биологических наук, профессор
Крючков Виктор Николаевич

Ведущая организация: Институт биологии внутренних вод им Папанина
РАН, Ярославская область, пос Борок

Защита состоится «6» ноября 2007 г. в 12⁰⁰ часов на заседании регионального
диссертационного совета ДМ 212 009 01 при Астраханском государственном
университете по адресу 414000, г Астрахань, пл Шаумяна, 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Астраханского государст-
венного университета по адресу 414000, г. Астрахань, пл Шаумяна, 1

Автореферат разослан «2» октября 2007 г

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Ю В Нестеров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. При огромном видовом разнообразии рыб, обитающих в водоемах России, осетровые всегда играли и продолжают играть особенную роль. Однако в большинстве районов обитания естественные популяции этих рыб находятся в депрессивном состоянии, отмечается дефицит производителей (Власенко и др., 2002, Корниенко и др., 2005; Кокоза, 2007). Поэтому единственным выходом из создавшейся ситуации является формирование продукционных стад на осетровых рыбоводных заводах (Васильева, 2006). При этом отбор особей в ремонтные группы по половому признаку осуществляют в первые годы выращивания. Для этого применяют два метода ранней диагностики пола – ультразвуковое сканирование (Астафьева и др., 2006а, 2006б) и визуальная оценка гонад при лапаротомии (Дегтярева, Лозовский, 2004а, 2004б).

Кроме того, в последние годы используют метод прижизненного получения икры подрезанием яйцеводов (Подушка, 1986). Все эти методы и технологические решения при выращивании и воспроизводстве осетровых требуют высокой стрессоустойчивости и удовлетворительного физиологического состояния рыбопосадочного материала и производителей. Однако стремительный рост антропогенных нагрузок и загрязнение водоемов отрицательно сказывается на физиологическом состоянии гидробионтов (Гераскин и др., 1998; 2004), степени их устойчивости, а также оказывает иммуносупрессивное действие (Валедская и др., 2000, Микряков и др., 2001). При этом, в большей степени страдает клеточное звено иммунитета, в частности отмечают лимфопению. Поэтому особую актуальность приобретают исследования физиологического состояния осетровых в условиях аквакультуры и внедрение новых экологически безопасных препаратов, повышающих иммунореактивность и стрессоустойчивость рыб. Значительная роль в этих исследованиях должна отводиться поиску биологически активных веществ с конкретно направленным действием на стимуляцию пролиферации лимфоцитов – клеток иммунного надзора.

Цель и задачи. Целью исследований являлось изучение влияния рекомбинантного интерлейкина-2 (rIL-2 – Ронколейкин) на физиолого-иммунологические и биологические показатели осетровых рыб в условиях стрессовых нагрузок различного генезиса.

Основные задачи работы

- 1 Изучить действие rIL-2 на физиолого-иммунологические показатели организма осетровых рыб средних ремонтных групп после лапаротомии с биопсией гонад и разработать методы введения препарата, определив его оптимальные терапевтические дозы.

- 2 Исследовать физиолого-иммунологический статус производителей осетровых рыб после подрезания яйцеводов при получении половых продуктов, применяя в качестве иммунореабилитатора rIL-2
- 3 Определить действие rIL-2 в различных дозах на организм молоди осетровых при его использовании в качестве профилактического средства при неблагоприятном температурном режиме и воздействии хендлинга

Научная новизна. Впервые получены данные по физиолого-иммунологическому статусу молоди осетровых рыб и их гибридов на первом году жизни при экстремальных воздействиях (неблагоприятный температурный режим, хендлинг) в условиях аквакультуры Нижнего Поволжья. Изучено влияние rIL-2 в различных дозах на регенерацию тканей, физиолого-иммунологические, биологические показатели и выживаемость средних ремонтных групп, производителей осетровых рыб и их гибридов после хирургического вмешательства. Научное обоснование и разработка способов иммунокоррекции рекомбинантным интерлейкином-2 осетровых рыб.

Практическая значимость. На основании проведенных исследований и полученных данных разработаны рекомендации по применению rIL-2 для реабилитации осетровых рыб разных возрастных групп после оперативного вмешательства, профилактики заболеваний и стресса у молоди осетровых.

Основные положения выносимые на защиту:

Результаты исследований влияния рекомбинантного интерлейкина-2 на физиолого-иммунологические и биологические показатели осетровых рыб при различных стрессовых нагрузках на их организм.

Апробация работы. В диссертации подведены итоги исследований, выполненных автором в 2005–2007 гг. Материалы работы обсуждались на IV Международной научно-практической конференции «Аквакультура осетровых рыб. достижения и перспективы» (Астрахань, 13-15 марта 2006 г.), Международном симпозиуме «Тепловодная аквакультура и биологическая продуктивность водоемов аридного климата» (Астрахань, 16-18 апреля 2007 г.), Международной конференции «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов-2» (п. Борок, ИБВВ им. И. Д. Папанина РАН, 17-20 июля 2007 г.). По материалам диссертации опубликовано 10 работ, имеется заявка на выдачу патента на изобретение №2007117985, приоритет от 28 апреля 2007.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературных данных, описания материала и методов исследования, собственных данных, обсуждения результатов исследований, выводов, рекомендаций и списка литературных источников, включающего 306 наименований, в том числе 68 зарубежных авторов. Текстовая часть изложена на 136 страницах машинописного текста, иллюстрированного 26 таблицами и 16 рисунками.

Материалы и методы исследований

1 Схемы проведения экспериментальных работ

Экспериментальные работы проводили на производственной базе ФГУП НПЦ по осетроводству «БИОС» в 2005–2006 гг

Экспериментальная работа с двухгодовиками гибрида белуга x стерлядь (бестер) (*Acipenser nkoljukini*) была осуществлена в мае–июне 2005 г. Для эксперимента было сформировано 3 группы рыб средней массой 1,65 кг. Лапаротомию проводили по методу Дегтяревой, Лозовского (2004). В группе «опыт-1» 10-ти рыбам вводили в хвостовую вену Ронколейкин в дозе 1000 ед./кг массы тела; группе «опыт-2» 10-ти рыбам – 2000 ед./кг, перед операцией Бестерам третьей группы (11 экз.) после операции вводили окситетрациклин пролонгированного действия – нитокс, в дозе 0,1 мл/кг биомассы. Все бестеры были индивидуально помечены.

Экспериментальная работа с производителями стерляди (*Acipenser ruthenus*, L.) была проведена в мае–июне 2006 г. Для эксперимента было сформировано 3 группы рыб, средней массой 1,47 кг. Прижизненное получение икры проводили методом С.Б. Подушки (1986). В группе «опыт-1» 10-ти рыбам после проведения операции вводили Ронколейкин в дозе 3000 ед./кг массы тела, группе «опыт-2» 11-ти рыбам – 5000 ед./кг. Ронколейкин вводили подкожно, двукратно с интервалом между инъекциями 24 часа, непосредственно после операции. Самкам стерляди из группы «контроль» (10 экз.) после операции не вводили каких-либо препаратов. Все стерляди имели индивидуальные метки.

Экспериментальная работа с молодьёю гибрида русско-сибирского осетра ранних сроков получения (*Acipenser gueldenshtadti*, В x *Acipenser baeri*, В) была проведена в июле 2005 г. при неблагоприятном температурном режиме воды (свыше 26,0 °С). Первая группа рыб в количестве 70 экз. была обработана Ронколейкином в дозе 200 тыс ед./100л воды, вторая (64 экз.) – 300 тыс ед./100 л, третья (84) – 400 тыс ед./100 л, четвертая (98 экз.) – контроль. В среднем биомасса рыб составила 6,25 кг на бассейн. Экспозиция препарата составляла 30 мин.

Экспериментальная работа с молодьёю белуги (*Huso huso*, L.) была проведена в сентябре 2006 г. Средняя масса молоди составляла 116,21 г при плотности посадки 6,99 кг на бассейн. Рыбам первой группы (75 экз.) вносили в корм Ронколейкин трехкратно, с интервалом 48 часов в дозе 2 тыс ед./кг массы тела, второй (75 экз.) – однократно 4 тыс ед./кг массы тела, третьей (75 экз.) однократно в дозе 6 тыс ед./кг массы тела, четвертая (75 экз.) была контролем. Всю молодь, каждые 7 дней подвергали хендлингу.

2 Методы физиолого-иммунологических исследований

При осмотре бестера оценивали состояние операционного шва, меток, кожных покровов, у производителей стерляди – состояние генитального отверстия. Отбор проб крови у рыб во всех экспериментах выполняли прижизненно пункцией хвостовой вены. Мазки крови фиксировали раствором Майн-Грюнвальда, докрашивали азур-эозином по Романовскому. Подсчет лейкоцитарной формулы проводили по методике Ивановой (1983), форменных элементов крови – в счетной камере Горяева, СОЭ – по методу Панченкова (Лиманский и др., 1984). Гемоглобин в крови определяли гемоглобинцианидным методом (метод Drabkin). Общий белок в сыворотке крови исследовали биуретовым методом (Меншиков, 1973), альбумин по реакции с бромкрезоловым зеленым (Лукичева, Синтебова, 1974), а иммуноглобулины по методике Воловенко М А (1975). Лизосомально-катионный тест (ЛКТ) проводили по методу Пигаревского В Е, Мазинга Ю А. (1981).

В качестве основных биологических показателей были приняты выживаемость, относительный среднесуточный прирост (CW, %), $CW = [2 * (M_t - M_0) / (M_t - M_0) * t] * 100\%$ (Винберг, 1959), коэффициент упитанности по Фульто-ну – $K_{(ф)} = 1/M^3$.

Мониторинг физико-химических условий водной среды ($T^{0}C$, O_2 , CO_2 , рН, перманганатная окисляемость, содержание NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+) осуществляли по унифицированным методикам.

Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами статистического анализа (Лакин, 1980) с использованием пакета программы Microsoft Excel. Достоверность отличий сравниваемых признаков оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Объем собранного и проанализированного материала представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Объем собранного и проанализированного материала

Вид рыб	Количество рыб (экз.)	Количество проб крови (шт.)	Количество анализов (шт.)
Двухгодовики гибрида белуга х стерлядь (бестер)	31	124	1240
Производители стерляди	31	124	1240
Молодь гибрида русский осетр х сибирский осетр	316	144	1440
Молодь белуги	300	240	2400
Итого	678	632	6320

Результаты исследований

1 Влияние rIL-2 на физиологические и биологические показатели средних возрастных категорий гибрида белуга х стерлядь (бестер) после лапаротомии с биопсией гонад

В результате ихтиопатологического обследования прооперированных рыб обнаружено, что развитие воспалительного процесса с последующей регенерацией тканей и рубцевания шва у рыб с инъекцией гЛ-2 происходила быстрее на 10-15 суток, чем у рыб и инъекцией антибиотика (таблица 2).

Таблица 2 – Клиническая картина операционных швов у бестеров

Доза и наименование препарата	Состояние шва в баллах	Всего рыб экз	Сутки		
			15	30	45
гЛ-2 1000 ед /кг массы тела (Опыт-1)	-	10	-	4	8
	+		-	3	2
	++		3	2	-
	+++		7	1	-
гЛ-2 2000 ед /кг массы тела (Опыт-2)	-	10	-	5	8
	+		-	3	2
	++		4	2	-
	+++		6	-	-
Окситетрациклин 0,1 мл/кг (Опыт-3)	-	11	-	2	5
	+		2	1	6
	++		5	5	-
	+++		4	3	-

Примечание – (-) – рубцевание разреза, снятие швов, (+) – гиперемия тканей, отечность, (++) – гиперемия тканей, отечность, выделение сукровицы, (+++) – гиперемия тканей, отечность, выделение сукровицы, некроз тканей

Относительный среднесуточный прирост у особей из групп (опыт-1) и (опыт-2), инъекцированных гЛ-2 был выше на 7,9 и 31,8%, чем у пролеченных антибиотиком рыб, соответственно по группам. На 45-е сутки отмечено повышение коэффициента упитанности при достоверных различиях ($p < 0,05$) между второй опытной группой и рыбами с инъекцией окситетрациклина.

Концентрация гемоглобина в крови после операции у рыб из всех групп, достоверно ($p < 0,05$) снижалась в течение тридцати дней и повысилась только к концу эксперимента (таблица 3)

Таблица 3 – Гематологические показатели бестеров

Вариант	Показатели	0 сутки	15 сутки	30 сутки	45 сутки
Опыт 1	Hb±	68,21±5,18*	62,50±5,22	49,27±4,50	68,40±5,77
Опыт 2	m(г/л)	93,85±5,19*	68,69±5,74	57,00±2,30	83,09±4,49
Опыт 3		85,77±3,79*	74,26±4,45	59,29±3,87	88,43±9,74
Опыт 1	Eg±m,	0,97±0,05*	0,81±0,07*	0,79±0,09	0,86±0,06
Опыт 2	10 ¹² л	1,07±0,05	1,16±0,10*	0,75±0,08	0,90±0,06
Опыт 3		1,22±0,07*	0,94±0,13*	0,90±0,11	1,00±0,08
Опыт 1	Hb/Eg	60,50±4,38*	80,99±6,68*	65,05±4,15	82,55±8,78
Опыт 2	±m пкг	88,39±4,85*	55,26±6,06*	73,71±6,18	95,03±9,42
Опыт 3		71,77±4,18*	87,99±10,32*	70,74±4,83	92,29±10,91
Опыт 1	Le±m,	0,03±0,01	0,21±0,03	0,17±0,03	0,07±0,02*
Опыт 2	10 ¹² л	0,04±0,00	0,23±0,04*	0,16±0,05	0,07±0,01*
Опыт 3		0,04±0,01	0,16±0,01*	0,21±0,06	0,14±0,05*

Примечание – (*) – различия достоверны ($p < 0,05$)

Компенсация гемоглобина после операционной кровопотери происходила различными путями у групп 1 и 3 на фоне снижения общего числа эритроцитов увеличивался Hb в одном эритроците, а у группы рыб, инъецированной gIL-2 в дозе 2000 ед /кг – за счет увеличения количества эритроцитов в крови на 43,2 и 23,4% относительно опыта-1 и контроля.

На 30-е сутки у этой группы рыб отмечено увеличение концентрации гемоглобина при снижении количества эритроцитов крови

В начале эксперимента у всех рыб была отмечена лейкопения (таблица 3) Впоследствии происходило увеличение абсолютного числа лейкоцитов в первой и второй опытной группе на 700,0 и 575,0%, в то время как у рыб с инъекцией окситетрациклина на 400,0% при $p < 0,05$ На 45 сутки уровень лейкоцитов в крови рыб из группы с антибиотиком превысил в 2,0 раза аналогичные показатели опытных вариантов ($p < 0,05$) При этом СОЭ также на 15-е сутки в группах (опыт-1 и опыт-2) была выше на 29,3 и 21,1%, соответственно по группам, чем в контроле Подобные значения СОЭ у рыб с инъекцией антибиотика зарегистрированы на тридцатые сутки при $p < 0,05$

В послеоперационный период концентрация общего белка в сыворотке крови достоверно снижалась ($p < 0,05$) на 33,4, 20,9, 34,7% в течение тридцати суток у всех групп рыб в основном за счет альбуминовой фракции, соответственно по группам – опыт-1, опыт-2, контроль. Уровень иммуноглобулинов (Ig) увеличивался на 18,6, 22,5, 22,5% соответственно по 1, 2, 3 группам рыб при $p < 0,05$ относительно дооперационных значений Между тем значимых различий между группами не зафиксировано ($p > 0,05$).

Данные таблицы 4 свидетельствуют о перераспределении относительного количества клеток в лейкограмме в сторону нейтрофилии ($p < 0,05$) со сдвигом влево у всех групп оперированных особей

Таблица 4 – Лейкоцитарная формула бестеров (%)

Вариант	Су-тки	Лимфоци-ты	Моноциты	Эозино-филы	Сегмен-тоядер-ные ней-трофилы	Палочко-ядерные нейтрофилы
Опыт-1	0	61,35±1,41*	2,28±0,34	10,08±0,54	7,71±0,39	17,21±1,01*
Опыт-2		65,20±1,84*	2,00±0,41	8,85±0,70	8,90±1,04	15,05±1,76*
Опыт-3		63,36±1,50*	2,18±0,40	9,32±1,18	6,73±0,77	18,41±2,17*
Опыт-1	15	40,80±3,83*	4,85±0,40	5,00±0,79	10,55±1,62	38,80±2,91*
Опыт-2		46,95±4,07*	3,40±0,46	5,25±0,90	10,85±1,99	33,55±3,10*
Опыт-3		40,64±3,51*	3,36±0,33	14,00±3,05	8,77±1,41	33,23±5,00*
Опыт-1	30	58,60±2,81	2,50±0,54	7,65±1,91	7,65±1,77	23,60±1,98
Опыт-2		57,75±4,35	3,10±0,71	6,75±1,09	8,35±2,11	24,05±3,18
Опыт-3		49,23±4,93	4,45±0,35	10,68±2,35	9,55±1,31	26,09±2,60
Опыт-1	45	64,30±1,64	2,90±0,29	9,90±1,44	8,00±1,74	14,90±1,37
Опыт-2		65,35±1,34*	3,50±0,40*	9,70±1,07	8,40±0,39	13,05±1,12*
Опыт-3		57,27±2,26*	2,27±0,33*	10,27±0,79	5,68±0,95	24,50±2,36*

Примечание – «*» – различия достоверны ($p < 0,05$)

Также у групп 1 и 2 увеличилось содержание моноцитов в 2,1 и 1,7 раза. Относительное число эозинофилов, напротив, уменьшилось в 2 и 1,1 раза, а в абсолютных значениях увеличилось в среднем в 3,5 раза. У рыб инъецированных окситетрациклином абсолютное количество эозинофилов превысило типичные показатели в 6,0 раз ($p < 0,05$), что, по всей видимости, обусловлено интоксикацией организма, вызванной окситетрациклином.

На 30–45 сутки у рыб отмечали профиль крови, имеющий лимфоидный характер, но у рыб 3-й группы зарегистрирована стабильная эозинофилия. Число эозинофильных гранулоцитов в группе рыб с антибиотиком превышало 2,2 раза при ($p < 0,05$) по сравнению с рыбами, которым был введен гЛ-2. При сопоставлении данных лейкограмм и лейкоцитарного профиля с клинической картиной в операционной области, выявлено, они характеризуют неодинаковую клиническую картину – острое воспаление у рыб, инъецированных гЛ-2 с последующей ускоренной регенерацией тканей, и вялотекущую воспалительную реакцию у бестеров с инъекцией окситетрациклина.

Лизосомально-катионный тест показал, что у рыб из всех экспериментальных групп, происходила супрессия функциональной активности палочкоядерных нейтрофилов, при этом средний цитохимический коэффициент (СЦК) достоверно снижался ($p < 0,05$). На 15-30 сутки в крови бестеров зарегистрировано увеличение числа незрелых форм гранулоцитов со сниженной способностью к фагоцитозу. Так, у групп рыб с дозой Ронколейкина 1 тыс ед/кг и 2 тыс ед/кг при увеличении численности палочкоядерных нейтрофилов в 2,3 и 2,2 раза СЦК снизился в 1,9 и 2,3 раза. У бестеров, инъецированных антибиотиком, уровень палочкоядерных нейтрофилов возрос в 1,8 раза, а СЦК уменьшился в 2,9 раза, это, вероятно, обусловлено не только оперативным вмешательством, как в первых двух случаях, но и дополнительным ингибированием окситетрациклином нейтропоза и его негативным воздействием на формирование гранулоцитов способных к фагоцитозу. Обнаружено, что при увеличении количества лимфоцитов в крови увеличивается и СЦК лизосомально-катионных белков нейтрофилов. Коэффициент корреляции между СЦК нейтрофилов и количеством лимфоцитов в крови бестеров составил 0,72. На сорок пятые сутки зарегистрировано некоторое увеличение среднего цитохимического коэффициента у группы особей, инъецированных гЛ-2 в дозе 2 тыс ед/кг. Это свидетельствует о более раннем восстановлении организма после оперативного вмешательства, в том числе фагоцитарной функции гранулоцитов, по сравнению с рыбами первой и третьей групп.

Таким образом, полученные данные демонстрируют явные преимущества рекомбинантного интерлейкина-2 в сравнении с окситетрациклином пролонгированного действия и, соответственно, цитокинотерапии перед антибиотикотерапией.

2 Влияние rIL-2 на физиологические и биологические показатели самок стерляди после операции прижизненного получения половых продуктов

При обследовании прооперированных самок обнаружено, что послеоперационное восстановление у рыб из группы с двукратной дозой 5 тыс ед /кг массы тела происходило в среднем на 7 суток быстрее, чем с дозой 3 тыс ед / кг и у контрольных рыб (таблица 5) Кроме того, в этих группах зарегистрирована гибель отдельных особей

Таблица 5 – Ихтиопатологическое состояние самок стерляди, подвергнутых хирургическому вмешательству (подрезание яйцеводов)

Вариант	Состояние рыбы в баллах	Всего рыб экз	Сутки			
			0	7	14	21
rIL-2 3 тыс ед /кг х 2 (Опыт-1)	-	10	-	-	1	5
	+		-	2	4	4
	++		6	3	4	-
	+++		4	5	1	-
	++++				1	
rIL-2 5 тыс ед /кг х 2 (Опыт-2)	-	11	-		4	9
	+			3	6	2
	++		8	4	1	-
	+++		3	3		-
	++++					
Контроль	-	10	-	-	1	4
	+		-	1	2	4
	++		7	4	4	-
	+++		3	2	1	-
	++++			1	1	

Примечание – «-» – норма, «+» – отечность генитального отверстия, «++» – отечность генитального отверстия, выделение сукровицы, «+++» – гиперемия, отечность генитального отверстия, выделение сукровицы, полостной жидкости, снижение мышечного тонуса, «++++» – гибель

До начала эксперимента все производители стерляди (1, 2, 3 группы), от которых впоследствии получили половые продукты – икру, были неоднородны по средней массе. Достоверные различия ($p < 0,001$) зарегистрированы между 1 и 2, 2 и 3 группами. При сопоставлении относительного прироста опытных и контрольной групп рыб в течение всего эксперимента выявлено, что особи из группы проинъекционной rIL-2 в дозе 5 тыс ед /кг массы тела прирост был несколько выше – в 1,2 и 1,3 раза, чем у группы с инъекцией 3 тыс ед / кг массы тела и контрольной соответственно. Однако достоверных различий не зарегистрировано.

При сравнении данных по коэффициенту упитанности по Фультону $K_{(ф)}$, обнаружено, что у всех экспериментальных рыб на нулевые сутки этот показатель снизился, причем у группы (опыт-1) на 10,4%, (опыт-2) на 14,6%, а у контрольных рыб на 19,86%, относительно аналогичных показателей до

получения половых продуктов При этом, достоверные изменения ($p < 0,001$) выявлены только у второй опытной группы и контроля Проведенный анализ показал, что в период 0–21 сутки коэффициент упитанности у стерляди повысился на 2,0, 4,8% соответственно по группам – 1, 2, а у контрольной группы рыб оставался без изменений Явные изменения зафиксированы только у второй опытной группы ($p < 0,05$)

Содержание Hb(г/л) у экспериментальных рыб было нестабильным, снижалось в течение семи суток при $p < 0,05$ и имело тенденцию к повышению только к 14 суткам (таблица 6)

Таблица 6 – Гематологические показатели самок стерляди

Вариант	Показатели	Сутки			
		-10	0	7	14
Контроль	Hb± m(г/л)	86,88±7,75	59,81±3,39	52,39±5,02	57,32±3,79*
Опыт-1		86,38±6,21	72,28±5,09	59,41±1,97	59,64±4,55*
Опыт-2		90,50±3,45	66,70±6,81	60,84±3,19*	68,96±2,31*
Контроль	Eг±m, 10 ¹² л	1,10±0,08	1,12±0,05	1,12±0,24	1,22±0,04
Опыт-1		1,06±7,75	0,92±0,06	0,90±0,17	0,88±0,09
Опыт-2		1,11±0,04	1,09±0,12	0,95±0,13	0,90±0,11
Контроль	Hb/Eг± m пкг	79,12±5,04	64,75±3,28	63,02±12,11	49,27±4,81*
Опыт-1		82,34±8,01	65,67±4,35	57,97±7,91	60,81±5,62*
Опыт-2		82,36±3,29	65,84±6,16	72,12±9,09	80,01±8,93*
Контроль	Le ±m, (млн/мм ³)	0,06±0,02	0,09±0,01	0,16±0,06	0,15±0,05
Опыт-1		0,07±0,01	0,10±0,02	0,20±0,03	0,12±0,02
Опыт-2		0,06±0,02	0,10±0,05	0,21±0,05	0,10±0,02

Примечание – «*» – различия достоверны ($p < 0,05$)

У группы особей, инъецированных гП-2 в дозе 5 тыс ед /кг массы тела, на 14-е сутки зарегистрировано увеличение гемоглобина, статистически достоверное ($p > 0,05$) во времени и по отношению к 1 и контрольной группе рыб на 15,6 и 20,4% соответственно. Численное значение этого показателя у рыб из группы, с инъекцией гП-2 в дозе 5 тыс ед /кг массы тела было выше относительно группы (опыт-1) и контроля на 31,6 и 62, 4% соответственно Это свидетельствует об улучшении состояния рыб из второй опытной группы

При анализе скорости оседания эритроцитов на седьмые сутки, обнаружено, что более высокие значения ($p < 0,05$) были у особей, которым двукратно, подкожно вводили гП-2 в дозе 5 тыс ед /кг массы тела Скорость оседания эритроцитов в крови в этой группе была на 13,1 и 19,1 % выше относительно (опыта-1) и контрольной группы рыб

Выявлено, что после операции концентрация общего белка в сыворотке крови уменьшалась в течение 14 суток на 21,1, 24,2, 18,2%, соответственно по группам (опыт-1), (опыт-2), (контроль), в основном, за счет альбуминовой фракции Доля иммуноглобулинов при этом находилась на одном уровне ($p > 0,05$) и возрастала только у группы рыб (опыт-2) при $p < 0,05$ Также у рыб

из всех групп, отмечено перераспределение процентного соотношения иммуноглобулинов к общему белку на 16,8, 37,2, 18,4 %, соответственно по группам (опыт-1), (опыт-2), контроль Однако только у второй опытной группы повышение процентного соотношения иммуноглобулинов было достоверным ($p < 0,05$) Кроме того, в этот период выявлены различия ($p < 0,05$) между второй опытной группой и контрольной на 7-е и между второй группой и первой опытными группами на 14-е сутки Это свидетельствует об усилении иммунореактивности у особой опытной группы с дозой гЛ-2 – 5 тыс ед /кг

В результате микроскопии мазков крови подопытных производителей стерляди зафиксировано, что в начале эксперимента их лейкограммы были относительно идентичны (таблица 7) При этом обнаружено, что $72 \pm 6,8\%$ эозинофилов были дегранулированными с сохранением целостности клеточной стенки, что свидетельствует о наличии цитотоксического эффекта

На нулевые сутки наблюдали достоверное ($p < 0,05$) перераспределение лейкограмм в сторону нейтрофилии со сдвигом влево у всех групп оперированных особей

Таблица 7 – Лейкоцитарная формула производителей стерляди (%)

Вариант	Су-тки	Лимфоциты	Моноци-ты	Эозинофи-лы	Сегментоя-дерные ней-трофилы	Палочкоя-дерные ней-трофилы
Опыт-1	-10	$77,42 \pm 2,59$	$2,33 \pm 0,93$	$1,25 \pm 0,48$	$5,92 \pm 1,63$	$13,08 \pm 1,85$
Опыт-2		$73,85 \pm 2,74$	$1,95 \pm 0,37$	$0,80 \pm 0,30$	$6,15 \pm 0,91$	$17,25 \pm 2,28$
Контроль		$70,01 \pm 6,77$	$3,20 \pm 0,64$	$1,00 \pm 0,22$	$8,00 \pm 1,72$	$17,79 \pm 5,25$
Опыт-1	0	$61,75 \pm 9,40$	$1,00 \pm 0,32$	$3,25 \pm 0,96$	$5,50 \pm 2,04$	$28,50 \pm 8,53$
Опыт-2		$63,55 \pm 6,14$	$1,45 \pm 0,29$	$4,20 \pm 0,82$	$7,10 \pm 1,26$	$23,70 \pm 5,44$
Контроль		$69,80 \pm 3,17$	$1,10 \pm 0,24$	$4,20 \pm 1,50$	$5,40 \pm 0,37$	$19,50 \pm 2,80$
Опыт-1	7	$54,50 \pm 6,81$	$1,00 \pm 0,32$	$2,08 \pm 0,59$	$10,58 \pm 2,46$	$31,83 \pm 5,88$
Опыт-2		$73,05 \pm 2,71$	$1,40 \pm 0,24$	$4,45 \pm 0,75$	$5,35 \pm 0,93$	$15,75 \pm 1,87$
Контроль		$54,40 \pm 5,56$	$3,00 \pm 0,32$	$6,00 \pm 1,82$	$9,60 \pm 2,06$	$27,00 \pm 5,87$
Опыт-1	14	$55,05 \pm 5,62$	$1,15 \pm 0,26$	$3,61 \pm 0,45$	$18,00 \pm 5,05$	$22,20 \pm 1,97$
Опыт-2		$69,50 \pm 1,77$	$1,35 \pm 0,24$	$4,00 \pm 0,54$	$10,40 \pm 1,67$	$14,75 \pm 1,24$
Контроль		$58,40 \pm 3,97$	$0,90 \pm 0,40$	$6,50 \pm 1,41$	$10,10 \pm 1,83$	$24,10 \pm 4,83$

Примечание – «*» – различия достоверные ($p < 0,05$)

Однако в абсолютном значении количество нейтрофилов осталось на прежнем уровне, составляя при этом 1,6, 1,6, 0,9 тыс.шт /мкл, соответственно по группам (опыт-1), (опыт-2), контроль Также увеличилось содержание эозинофилов у рыб из первой опытной группы в 2,6 у второй – 5,3, у контрольных в 4,2 раза, а в абсолютном значении количество этих клеток возросло до 3,3, 4,0 и 3,8 тыс шт /мкл соответственно Несмотря на то, что анализ лейкограмм свидетельствует о снижении относительного числа лимфоцитов в первом и во втором опытных вариантах в 1,3 и 1,2 раза, а в контроле оно осталось почти на прежнем уровне, их абсолютное количество возросло на 8,5,

29,9, 30,9% соответственно по группам Абсолютное количество моноцитов в крови несколько снизилось в среднем с 1,5 до 1,1 тыс шт /мкл

На седьмой день исследований в лейкоцитарной формуле у рыб из группы, проинъектированных rIL-2 в дозе 5 тыс.ед /кг происходило увеличение количества лимфоцитов ($p < 0,05$), у особей из первой опытной и контрольной, продолжалось снижение количества лимфоцитов и увеличение числа палочкоядерных, сегментоядерных нейтрофилов. При этом абсолютное число лимфоцитов в крови продолжало повышаться, достигая значений – 109,0; 149,8, 89,2 тыс шт /мкл, соответственно по группам рыб: опыт-1, опыт-2, контроль. Абсолютное число моноцитов также имело тенденцию к повышению. Однако данный показатель у рыб из контрольной группы был на 59,3 и 41,7% выше, чем у производителей стерляди из групп (опыт-1) и (опыт-2), что может свидетельствовать о развитии бактериемии или увеличением продуктов распада в крови. К четырнадцатому суткам лейкоцитарная формула сохранялась, при этом отмечено снижение абсолютного числа лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов, палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов практически до первоначальных показателей. Однако у рыб из группы контроля зарегистрировано превышение числа эозинофилов в среднем на 43,2%, отчисительно опытных групп.

При проведении лизосомально-катионного теста выявлены, различия ($p < 0,05$) на 7-е и 14-е сутки после введения rIL-2 между второй опытной и первой опытной, контрольной группами рыб. Коэффициент корреляции между СЦК нейтрофилов и уровнем лимфоцитов в крови производителей стерляди составил – 0,79.

Таким образом, при исследовании физиологического состояния производителей стерляди, выявлено, что также как и в случае двухгодовиками бестера в крови рыб происходят аналогичные изменения. Исключение составляют такие показатели как количество лейкоцитов в крови и лейкоцитарная формула. При этом различия касаются только сроков реабилитации, поскольку у стерляди уже на 14 сутки количество лейкоцитов в крови было практически на уровне первоначальных значений. Это, скорее всего, обусловлено тем, что травматизация при подрезании яйцеводов менее существенная, чем лапаротомия с биопсией гонад. Однако минимальная терапевтическая доза при подкожном введении была выше, чем при внутривенном, что, по-видимому, связано с особенностями организации иммунной системы осетровых рыб, в частности отсутствием подлежащих лимфатических узлов в отличие от теплокровных организмов.

3 Влияние rIL-2 на физиологические и биологические показатели молоди гибрида русско-сибирского осетра (РО x СО) в условиях неблагоприятного температурного режима

В условиях Юга России на осетровых хозяйствах рыбоводы часто сталкиваются с проблемами, связанными с ухудшением условий выращивания рыб, особенно при высоких температурах воды. Поэтому данная работа была приурочена температурам воды выше оптимальных для выращивания осетровых рыб +25 °С.

В начале эксперимента все особи были однородны по средней массе. Только на тридцатые сутки отмечены различия ($p < 0,05$) между группами опыт-2, -3 и контролем. При этом относительный прирост особей в опыте-2 был выше на 50,9 %, чем в контроле, на 44,9%, чем в опыте-1, а прирост рыб из группы опыт-3 превосходил контрольных на 44,6 и на 37,9% молодь первой опытной группы.

При анализе гематологических показателей осетровых (таблица 8) обнаружено, что между 2-м и 1, 3, 4-м вариантами имеются достоверные ($p < 0,05$) различия по количеству лейкоцитов на 15-е сутки исследований.

Таблица 8 – Гематологические показатели молоди гибрида РО x СО

Вариант	Показатели	0 сутки	15 сутки	30 сутки
контроль	Hb± m(г/л)	51,82±1,78	50,30±3,37	56,62±1,73
Опыт-1		49,25±3,34	47,95±3,05	54,20±1,93
Опыт-2		50,50±2,57	42,65±2,05	53,23±2,53
Опыт-3		51,00±2,88	50,10±3,20	56,98±2,46
контроль	Er±m, 10 ¹² л	0,84±0,06*	0,53±0,04*	0,86±0,09
Опыт-1		0,79±0,05*	0,58±0,09*	0,84±0,11
Опыт-2		0,86±0,07*	0,69±0,03	1,12±0,07
Опыт-3		0,81±0,05	0,55±0,03*	0,90±0,11
контроль	Hb /Er ±m, пкг	65,20±7,12	97,72±6,43	72,96±8,57
Опыт-1		71,07±7,09	87,26±10,25	75,19±10,43
Опыт-2		65,90±5,39	67,67±6,12	50,86±4,20
Опыт-3		75,66±4,43	92,54±5,35	65,90±4,22
контроль	СОЭ± m мм/ч	4,50±0,53	5,65±0,17	3,55±0,17
Опыт-1		4,29±0,75	5,95±0,24	3,50±0,13
Опыт-2		4,60±0,72	4,30±0,11	3,55±0,20
Опыт-3		4,91±0,56	5,20±0,13	3,15±0,11
контроль	Le ± m (10 ¹² л)	0,05±0,00	0,04±0,00*	0,06±0,02
Опыт-1		0,04±0,01*	0,07±0,02	0,07±0,01
Опыт-2		0,03±0,00*	0,09±0,01*	0,06±0,00
Опыт-3		0,05±0,01*	0,08±0,01*	0,06±0,00

Примечание – «*» – различия достоверны ($p < 0,05$)

Зарегистрировано увеличение данного показателя у рыб из опытных вариантов на 75,0, 200,0, 60,0%, соответственно по группам, опыт-1, опыт-2, опыт-3. Это свидетельствует о напряженности клеточного иммунитета и связано с усилением иммунореактивности благодаря гИЛ-2. В контроле число лейкоцитов снизилось на 20,0%, это, вероятно, обусловлено угнетением лейкопоза и

негативным воздействием на организм рыб высоких температур водной среды в этот период

Анализ концентрации общего белка и альбуминов не выявил достоверных различий между группами экспериментальных рыб на протяжении всего эксперимента. Однако зарегистрированы изменения уровня иммуноглобулинов в сыворотке крови и соответственно значимые различия ($p < 0,05$) между контролем и опытом 3, между опытом 1 и 2, на 15-е сутки. По-видимому, интерлейкин-2 в дозах 300 и 400 тыс ед /100 л оказал наибольшее стимулирующее влияние на синтез иммуноглобулинов.

Данные таблицы 9 показывают, что на 15-е сутки зафиксировано перераспределение соотношения в лейкограмме контрольных рыб и группы, обработанной rIL-2 , в дозе 200 тыс ед /100 л.

Таблица 9 – Лейкоцитарная формула молоди гибрида РО x СО (%)

Вариант	Сутки	Лимфоциты	Моноциты	Эозинофилы	Сегментоядерные нейтрофилы	Палочкоядерные нейтрофилы
Контроль	0	61,00±4,54	2,09±0,39	20,75±2,92*	4,45±0,77	14,09±2,26
Опыт-1		68,95±1,91*	2,11±0,43	9,55±0,99*	5,86±0,83	13,53±0,80
Опыт-2		57,15±5,27*	2,43±0,39	17,50±3,24*	4,49±0,80	11,16±2,35
Опыт-3		69,66±4,31	2,14±0,32	14,33±2,85	5,33±0,61	12,40±1,84
Контроль	15	60,68±1,19	2,24±0,18	14,12±1,92	7,93±1,05	15,03±1,55
Опыт-1		63,75±4,97	2,50±0,49*	10,20±2,20*	6,50±1,80	17,05±3,11
Опыт-2		75,73±1,45	1,35±0,47	6,19±0,79	4,50±1,16	12,23±1,50
Опыт-3		67,79±3,10	2,33±0,53	8,63±1,36	6,83±0,93	14,42±2,21
Контроль	30	65,75±1,38	1,95±0,31	12,85±2,04	9,40±1,20	11,25±1,46
Опыт-1		70,75±2,53	2,30±0,51	7,95±1,49	6,50±1,71	12,50±1,33
Опыт-2		75,65±1,49	1,50±0,46	4,95±0,78*	4,95±1,16	13,35±1,40
Опыт-3		69,96±2,82	2,08±0,35	7,08±1,14	7,33±0,94	13,54±2,21

Примечание – * – различия достоверны ($p < 0,05$), ** – различия достоверны ($p < 0,001$)

В контроле число эозинофилов снизилось на 31,95%, а в опыте-1 уменьшилось количество лимфоцитов на 7,54 %, доля палочкоядерных нейтрофильных гранулоцитов возросла, но изменения последних были в пределах ошибки. В абсолютных значениях была отмечена иная картина. Так, у рыб из группы контроля зафиксировано снижение количества лимфоцитов и эозинофилов на 20,3 и 46,1% соответственно, а у молоди из первого опытного варианта, напротив, число лимфоцитов и эозинофилов повысилось на 61,5 и 21,0%, соответственно, по формам клеток. При этом у групп рыб, которых обрабатывали иммунокорректором в дозах 300 и 400 тыс ед /100 л отмечена та же тенденция, при которой численность лимфоцитов в крови молоди РО x СО также возросла, причем довольно значительно – в 3,9 и 1,6 раза, относительно первоначальных показателей. Это, очевидно, обусловлено стимуляцией rIL-2 лимфопоэза. Статистический анализ позволил выявить различия

($p < 0,001$) по числу лимфоцитов между контролем и всеми опытными группами рыб и между вариантами с дозами 200 тыс ед - и 300 тыс ед /100 л ($p < 0,05$) Кроме того, достоверные различия были между группами особей с дозами 300 тыс ед - и 400 тыс ед /100 л и контролем по количеству моноцитов при $p < 0,05$ и эозинофилов ($p < 0,001$).

На тридцатые сутки эксперимента лейкоцитарная формула у всех групп РО х СО практически не изменилась относительно такового на предыдущем этапе исследований Однако отмечено продолжающееся уменьшение числа эозинофильных гранулоцитов относительно первоначальных показателей (нулевые сутки) в 1,6, 1,2, 3,5, 2,0 раза соответственно по группам контроль, опыт-1, -2, -3, это, видимо, связано, с понижением температуры воды до 22°C Достоверные различия в соотношении лейкоформул подопытных рыб обнаружены между группами рыб с дозой rIL-2 300 тыс -, 400 тыс ед /100л и контролем по лимфоцитам, эозинофилам и сегментоядерным формам нейтрофилов Численность моноцитов в как относительном, так и в абсолютных показателях практически сохранялась на протяжении всего эксперимента у всех групп рыб

В начале экспериментальных работ у рыб всех групп обнаружено довольно низкое содержание лизосомально-катионных белков в палочкоядерных нейтрофилах (0,55 – 0,60 у е) На пятнадцатые сутки СЦК у рыб из опытных групп несколько повысился, но при этом достоверных временных различий не выявлено У контрольных особей, наоборот, имел тенденцию к уменьшению Это происходило на фоне увеличения доли палочкоядерных нейтрофилов На тридцатые сутки эксперимента у групп рыб, обработанных rIL-2 в разных дозах, отмечено увеличение числа клеток, содержащих большое количество катионных белков. Так, у групп рыб с дозами препарата – 200 тыс ед , 300 тыс.ед и 400 тыс ед /100 л при численности ПЯН – $12,5 \pm 1,3$, $13,54 \pm 1,4$ и $13,54 \pm 2,2\%$, СЦК лизосомально-катионных белков повысился в 1,2, 1,3, 1,1 раза соответственно, относительно предыдущего исследования Контрольная группа ($p < 0,05$) отличалась более низкими показателями При анализе корреляционной зависимости коэффициент корреляции составил – 0,33, что говорит о слабой связи, это, вероятно, обусловлено, тем, что у рыб отсутствовал патологический процесс.

4 Влияние rIL-2 на физиологические и биологические показатели молоди белуги в условиях систематического хендлинга

В результате изучения динамики размерно-весовых показателей молоди белуги, находящейся под воздействием регулярного хендлинга, обнаружено отставание рыб группы контроля по средней массе и длине на 6,22 % и 8,73% соответственно по показателям от особей группы 3 При этом различия между контролем и опытом 3 были достоверны при $p < 0,05$ Также отличалась

на 9,88% от третьей опытной группы рыб по средней массе молодь из первой опытной с дозой Ронколейкина – 2 тыс ед /кг массы тела с трехкратной дозой препарата в корм. При детальном изучении данных процессов обнаружено, что в период с 14 по 21 сутки отмечено снижение темпа роста у особей из всех групп. Периоды усиления и снижения относительного прироста у рыб связаны с тем, что накопление массы чередуется с ростом в длину. Причем характер изменений может свидетельствовать о состоянии организма рыб. Так, контрольные рыбы имели самые низкие показатели с 14 по 28 сутки эксперимента. В этот же период у этой молоди наблюдали покраснение брюшных жучек. Это, вероятно, связано с тем, что эта молодь была больше подвержена стрессу в отличие от молоди из опытных вариантов. Кроме того, в период с 14 по 21 сутки отмечено, что молодь белуги из опыта-1 в среднем росла интенсивнее на 41,88% относительно контрольного, второго и третьего опытного вариантов. Это, по-видимому, обусловлено пролонгированным действием гЛ-2 в низких дозах при многократном, пероральном введении препарата. Однако при анализе коэффициента упитанности (К(Ф)) особых различий между группами не зарегистрировано.

Данные таблицы 10 свидетельствуют, что под воздействием контактно-го стресса в крови всей молоди белуги, участвующей в эксперименте, происходили достоверные изменения ряда гематологических показателей в течение всего периода эксперимента.

Таблица 10 – Гематологические показатели молоди белуги

Вариант	Показатели	0 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	28 сутки
Контроль	Pb ± m г/л	41,55±0,86	51,39±1,87	51,05±1,50	48,79±1,57	45,15±1,47
Опыт-1		43,44±1,08	50,74±2,43	57,77±4,84	54,37±1,91	45,32±1,33
Опыт-2		43,47±0,92	49,08±1,55	53,20±1,52	50,99±3,42	41,68±2,04
Опыт-3		41,51±0,97	45,27±1,89	44,83±4,55	47,25±2,77	48,17±3,15
Контроль	Hb/Er± m пкп	57,30±3,61	77,27±5,19*	68,38±5,42	64,07±3,91	85,43±5,83*
Опыт-1		47,49±4,17	60,80±2,54	56,62±4,75	68,56±5,67	77,77±5,04
Опыт-2		50,80±3,91	66,30±4,37	55,38±3,22	65,66±6,69	68,49±5,39*
Опыт-3		54,66±3,99	57,39±5,62*	76,11±7,99	75,85±6,06	69,97±6,36
Контроль	Er ± m, 10 ⁻¹² л	0,81±0,04	0,69±0,05	0,79±0,06	0,78±0,04	0,55±0,04*
Опыт-1		0,99±0,07	0,84±0,04	1,04±0,05*	0,83±0,06*	0,61±0,06
Опыт-2		1,02±0,03	0,76±0,04	0,99±0,06	0,81±0,05	0,64±0,06
Опыт-3		0,89±0,06	0,84±0,07	0,59±0,03*	0,65±0,05*	0,74±0,08*
Контроль	Le ± m 10 ⁻¹² л	0,13±0,01	0,07±0,01*	0,07±0,00	0,07±0,00*	0,04±0,00
Опыт-1		0,14±0,00	0,12±0,00*	0,07±0,00	0,09±0,13*	0,06±0,00
Опыт-2		0,13±0,00	0,09±0,00	0,07±0,00	0,06±0,00*	0,05±0,00
Опыт-3		0,11±0,01	0,09±0,00	0,09±0,00	0,08±0,10	0,07±0,00

Примечание – «*» – различия достоверны при p<0,05

В первые две недели отмечено повышение уровня гемоглобина на 18,60, 24,80, 18,28 %, соответственно в контроле опыт-1, -2, по отношению к первоначальным показателям. При этом исключением были особи опыта-3, которым однократно в корм был внесен Ронколейкин в дозе 6 тыс ед./кг массы тела. К концу эксперимента у особей из всех групп рыб этот показатель практически был равен первоначальным значениям. Однако количество эритроцитов в крови снизилось на 47,27, 62,29, 37,83, 20,27 %, соответственно по группам контроль, опыт-1, опыт-2, опыт-3. Что свидетельствует о процессах истощения депонированного резерва этих клеток под воздействием регулярного хендлинга. При этом концентрация гемоглобина в одном эритроците была выше, чем в начале эксперимента на 32,92, 38,93; 25,82; 21,88% соответственно по группам рыб.

Абсолютное количество лейкоцитов в крови молоди белуги к концу эксперимента снизилось на 69,23, 57,14, 61,53 и 36,16% соответственно по группам рыб (контроль, опыт-1, опыт-2, опыт-3). Это, вероятно, связано не только с негативным влиянием регулярного стресса, но и со снижением температуры воды. При анализе этого показателя на седьмые сутки обнаружено, что количество лейкоцитов у рыб с трехкратной дозой rIL-2 в дозе 2 тыс ед./кг и однократной – в дозах 4–6 тыс ед./кг было на 1,7, 1,2 и 1,2 раза выше, чем у контрольных особей ($p < 0,05$). До конца эксперимента эта тенденция сохранялась, в среднем разница между этими группами и контролем составила 25,00%.

В результате анализа биохимических показателей сыворотки крови обнаружено, что на 7–28 сутки у особей из всех вариантов зарегистрировано увеличение общего белка в сыворотке крови на 21,08, 25,31, 27,43, 17,36%. При этом достоверных различий между группами не выявлено.

На 21 и 28-е сутки зарегистрированы достоверные различия ($p < 0,05$) по уровню иммуноглобулинов и отношению иммуноглобулинов к общему белку между контрольной и первой опытной группой. При этом у рыб из группы контроля концентрация иммуноглобулинов в сыворотке крови была в среднем на 18,8% ниже, чем у опытных рыб и на 14,4% относительно первоначальных показателей.

Наиболее существенные изменения зарегистрированы со стороны клеточного иммунитета. В самом начале эксперимента в лейкоцитарной формуле молоди белуги отмечен ярко выраженный гранулоцитоз, обусловленный эозинофилией (таблица 11). В дальнейшем у рыб из опытных групп отмечено уменьшение числа эозинофилов в крови в среднем в 2,06 раза относительно первоначальных показателей, а в абсолютном значении на 168,69, 213,65, 211,54%, соответственно по группам опыт-1, опыт-2, опыт-3 и увеличение абсолютной численности лимфоцитов в среднем в 1,5 раза.

Таблица 11 – Лейкоцитарная формула молоди белуги (%)

Вариант	Сутки	Лимфоциты	Моноциты	Эозинофилы	Сегментоядерные нейтрофилы	Палочкоядерные нейтрофилы
Контроль	0	37,71±2,26	1,64±0,26	27,93±3,50	9,36±1,13	24,36±2,20
Опыт-1		40,56±2,30	1,25±0,21	30,50±2,70	10,56±3,12	16,13±1,98
Опыт-2		38,32±3,45	2,14±0,19	28,12±3,55	6,92±0,98	24,49±3,65
Опыт-3		40,60±2,66	0,90±0,48	25,60±3,13	10,90±2,21	22,00±2,18
Контроль	7	32,89±2,60*	2,25±0,53	31,86±3,74*	7,11±1,01	25,89±2,62
Опыт-1		48,18±1,61*	3,41±0,48	13,14±0,80*	11,82±1,40	23,45±2,08
Опыт-2		47,55±1,98	4,40±1,02	13,10±1,41*	11,45±1,47	23,50±1,79
Опыт-3		44,70±2,88	4,45±0,76	13,10±1,37*	10,60±0,97	27,15±3,05
Контроль	14	37,75±3,28	0,85±0,25	21,35±1,30	15,10±1,84	24,95±2,23
Опыт-1		54,09±2,89	4,18±0,40	12,45±1,47	9,91±1,68	19,36±2,38
Опыт-2		47,45±2,32	2,25±0,34	17,35±2,24	12,50±1,08	20,45±1,65
Опыт-3		46,50±2,22	4,45±0,53	15,60±1,29	12,05±1,49	21,40±1,73
Контроль	21	37,70±3,15*	3,95±1,17	23,70±2,94	8,75±1,85	25,90±3,08
Опыт-1		53,23±3,06*	2,27±0,41	12,45±1,18	11,73±1,67	20,32±1,50
Опыт-2		45,80±2,61	3,25±0,63	20,35±3,33	10,40±1,93	20,20±3,26
Опыт-3		41,35±3,67	2,95±0,71	17,65±2,16	12,25±1,96	25,80±2,52
Контроль	28	32,10±2,99*	2,20±0,37	23,75±3,36*	14,50±1,48	27,45±2,33*
Опыт-1		47,41±1,97*	2,55±0,43	16,00±1,69*	14,73±1,27	19,32±1,66*
Опыт-2		44,90±3,35	1,60±0,35	15,00±1,64*	15,65±1,92	22,45±1,12
Опыт-3		47,95±2,42*	2,55±0,32	20,05±2,72	12,10±1,62	17,35±2,35*

Примечание – «*» – различия достоверны ($p < 0,05$)

У контрольных особей абсолютное число эозинофилов снизилось на 58,23%, при $p < 0,05$. При этом обнаружены различия по абсолютному количеству лимфоцитов между группой контроля и опытом-1 при $p < 0,05$.

К двадцать восьмым суткам у рыб из контрольной группы на фоне снижения абсолютного числа клеток иммунного надзора – лимфоцитов на 30,8%, происходило снижение количества других клеток белой крови выполняющих цитотоксические функции, в том числе эозинофилов на 27,8%, сегментоядерных нейтрофилов на 50,0%, относительно первоначальных показателей, что свидетельствует о явных иммунологических нарушениях. Данные показатели у молоди белуги из опытных групп, также имели тенденцию к снижению, но изменения были менее ощутимы по сравнению с опытом. При оценке ЛКТ выявлено, что на протяжении всего эксперимента у особей из контрольной группы СКЦ был нестабилен и к концу эксперимента снизился на 14,7% относительно первоначальных показателей. Тогда как у рыб из группы, которым был перорально трехкратно введен pIL-2 в дозе 2 тыс ед/кг массы тела СКЦ возрос на 53,4%, у молоди из второй и третьей опытных групп на 45,83 и 53,78. При этом различия между СКЦ рыб из кон-

трольного и всех опытных вариантов были существенными ($p < 0,05$) Коэффициент корреляции данного показателя и количеством лимфоцитов в крови составил 0,83

Иммунодефициты у осетровых как в естественной среде обитания, так и при искусственном выращивании способствуют снижению антителообразовательной функции организма и его защищенности от внешних воздействий микробного типа и ксенобиотиков Поэтому особый интерес возник при возможности иммунокоррекции осетровых рыб рскомбинантным интерлейкином-2.

В результате собственных исследований физиологических показателей бестеров и самок стерляди, подвергнутых операционному вмешательству зарегистрированы изменения в красной и белой крови Показано, что у оперированных бестеров, инъецированных Ронколейкином в дозе 2000 ед /кг массы тела и производителей стерляди – в дозе 5 тыс ед /кг при двукратном введении, отмечено усиление эритропоза, пролиферации лимфоцитов, восстановление фагоцитарной функции нейтрофильных гранулоцитов.

Выявлено, что различия между сроками репарации и минимальными эффективными дозами препарата в случае с бестерами из первого эксперимента и стерлядью из второго обусловлены техникой введения rIL-2, особенностями организации иммунной системы осетровых рыб и степенью повреждения тканей при хирургическом вмешательстве

При исследовании гематологических, физиолого-иммунологических и биологических показателей молоди русско-сибирского осетра, обнаружено, что повышение температуры воды выше оптимальных рыбоводно-нормативных значений сказывается на физиологическом статусе данного гибрида, т е происходит ослабление защитных функций, касающихся клеточного иммунитета и существует риск возникновения заболевания у молоди осетровых рыб В результате применения Ронколейкина в качестве иммунокорректора при неблагоприятном температурном режиме отмечено, что rIL-2 способствует усилению лейкопоза, особенно в дозе 300 тыс ед./100 л, и в дозах 300 тыс ед /100 л и 400 тыс.ед /100 л оказывает наибольшее стимулирующее влияние на выработку иммуноглобулинов

Проведенные исследования показали, что увеличение времени контакта с рыбой и усложнение манипуляций с молодью белуги способствует снижению концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови рыб, а также, приводит к серьезным нарушениям в лейкопозе. Кроме того, снижается способность палочкоядерных нейтрофилов к фагоцитозу При этом довольно в короткий срок, создаются предпосылки для развития вторичного иммунодефицита и возникновения вторичных заболеваний у рыб Пероральное применение Ронколейкина при подготовке рыбы к рыбоводным манипуляциям, способствует коррекции соотношения форменных элементов, сохранению лимфоидного характера крови осетровых рыб Показано, что реакция орга-

низма рыб на Ронколейкин судя по физиолого-иммунологическим показателям крови отмечается уже на 7-е сутки от начала терапии, а клинически – в среднем на 10-е, 15-е сутки

Таким образом, апробация рекомбинантного интерлейкина-2 (Ронколейкин) в качестве средства пред- и послеоперационной реабилитации средних ремонтных групп и производителей, а также в качестве иммунокорректора при профилактике стресса у молоди осетровых рыб и их гибридов доказала возможность и необходимость использования данного препарата

ВЫВОДЫ

1 Обнаружено, что на различных этапах рыбоводного процесса существует риск возникновения заболевания рыб, связанный с развитием вторичных иммунодефицитных состояний и ослаблением общего физиологического статуса

2 Рекомбинантный интерлейкин-2, оптимизируя обменные процессы организма, способствует ускорению и значительному соматическому росту у осетровых рыб младших и средних возрастных категорий, в том числе после оперативного вмешательства с целью оценки состояния гонад

3 Рекомбинантный интерлейкин-2 стимулирует гемо- и иммунопоэз, существенно увеличивая рост числа форменных элементов крови и в определенных дозах, выработку иммуноглобулинов

4 Экспериментально установлено позитивное влияние интерлейкина-2 на клеточный иммунитет, в первую очередь на активацию пролиферации лимфоцитов и восстановление фагоцитарной функции нейтрофилов крови осетровых рыб и их гибридов

5 Рекомбинантный интерлейкин-2 способствует активной регенерации тканей после хирургической травматизации и более ранней их репарации у осетровых рыб.

6 Положительный эффект рекомбинантного интерлейкина-2 на организм осетровых рыб проявляется примерно на 7-й день после воздействия с пролонгацией иммуностропного эффекта до 15 – 45 суток в зависимости от дозы, методики введения, причин, определяющих необходимость иммунокоррекции

7 Показано, что механизм действия rIL-2 на физиологическое состояние осетровых имеет дозозависимый характер и не зависит от видовых особенностей рыб

8 Установлено, что воздействие рекомбинантного интерлейкина-2 на организм осетровых рыб имеет принципиально общие черты и функциональное сходство с его действием на организм теплокровных животных.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ДЛЯ ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ИММУНОКОРРЕКЦИИ, ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОЙ РЕАБИЛИТАЦИИ И ПОВЫШЕНИЮ ЖИЗНЕСТОЙКОСТИ МОЛОДИ ОСЕТРОВЫХ РЫБ И ИХ ГИБРИДОВ В УСЛОВИЯХ АКВАКУЛЬТУРЫ

1 Для предотвращения возникновения осложнений после хирургического вмешательства рекомендовано внутривенное однократное введение гИЛ-2 до операции в дозе 2 тыс ед /кг массы тела рыбы После операции рекомендована двукратная подкожная инъекция препарата с интервалом 24 часа – 5 тыс ед /кг массы тела Перед применением препарат разводят водой для инъекций или стерильным 0,65% физиологическим раствором в объеме, зависящем от размера и массы рыбы от 0,5 до 3,5 мл

2 В качестве иммунокорректора и антистрессанта для повышения жизнестойкости молоди осетровых рыб и их гибридов рекомендовано пероральное введение гИЛ-2 Перед применением рассчитанную дозу препарата следует развести физиологическим раствором из расчета 16 мл р-ра на 1 кг корма Введение Ронколейкина в корм осуществляется посредством напыления полученного раствора на гранулу, с последующим обжириванием, однократно за 7 дней до ожидаемого разового стресса в дозе 6 тыс ед /кг массы тела рыбы или трехдневным курсом с интервалом 48 часов в дозе 2 тыс ед / кг массы тела при стрессах, связанных с хендлингом

3 Для молоди до 100 г можно применять получасовые ванны с гИЛ-2 в дозе 300 тыс ед /100 л или – 400 тыс ед./100 л воды с прекращением водообмена и принудительной оксигенацией Применение данного метода может быть целесообразно в случае отсутствия питания у рыб.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1 Касаева, С Ю К вопросу о необходимости осуществления санитарно-профилактических мероприятий при индустриальном выращивании осетровых рыб / С Ю Касаева, Н В Судакова // Вестник Кабардино-Балкарского университета Серия Биологические науки – Вып 7 –Нальчик Каб -Балк ун-т, 2005 – С 104–107

2 Касаева, С Ю Основные периоды иммунокоррекции молоди гибрида русский осетр х сибирский осетр ранних сроков получения на первом году жизни / С Ю Касаева, О А Письменная, Е Н Савенкова // Аквакультура осетровых рыб достижения и перспективы развития Материалы докл IV Междунар науч практ конф, 13-15 марта. Астрахань. – М Изд-во ВНИРО, 2006 – С 247–251

3 Касаева, С Ю Предоперационная иммунокоррекция гибрида (белуга х стерлядь) в условиях индустриального рыбоводства / С Ю Касаева, Н В Судакова, О А Письменная, Е Н Савенкова, А Н Дегтярев // Аквакультура осетровых рыб достижения и перспективы развития Материалы докл IV Междунар науч практ конф, 13-15 марта. Астрахань – М Изд-во ВНИРО, 2006 – С 254–257

4 Касаева, С Ю К вопросу о проведении цитохимического метода исследования лизосомально-катионных белков нейтрофилов осетровых рыб / С Ю Касаева, Е Н Савенкова // Аквакультура осетровых рыб достижения и перспективы развития Материалы докл IV Междунар науч практ конф, 13-15 марта Астрахань – М Изд-во ВНИРО, 2006 – С 251–254

5 Касаева, С Ю Влияние рекомбинантного интерлейкина-2 на физиологические показатели гибрида белуга \times стерлядь (бестер) после хирургического вмешательства для оценки развития гонад / С Ю Касаева, Е А Федосеева // Вестник Астраханского государственного технического университета № 4(39)/2007, июль-август, Астрахань Изд-во АГТУ, 2007 – С 103–109

6 Касаева, С Ю Физиолого-иммунологические аспекты сохранения биоразнообразия осетровых рыб/ С Ю Касаева, Е А Федосеева // Естественные и инвазийные процессы формирования биоразнообразия водных и наземных экосистем Тезисы докл межд науч конф (г Ростов-на-Дону, 5-8 июня) – Ростов-н/Д Изд-во ЮНЦ РАН, 2007 – С 152–153

7 Касаева, С Ю Влияние рекомбинантного интерлейкина -2 (rIL-2) на показатели белой крови производителей стерляди после хирургического вмешательства / С Ю Касаева, Н В Судакова, Е Н Савенкова // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов – 2 Расширенные мат-лы Межд науч - практ конф Борок – Москва, 17-20 июля 2007 – С 37–40

8 Касаева, С Ю Влияние систематического хендлинга на некоторые физиолого-иммунологические показатели молоди белуги (*Huso huso*) / С Ю Касаева, Е Н Савенкова // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов – 2 Расширенные мат-лы Межд науч - практ конф Борок – Москва, 17-20 июля 2007 – С 351–354

9 Судакова, Н В Иммунокоррекция русско-сибирского осетра при неблагоприятном температурном режиме / Н В Судакова, С Ю Касаева, О А Письменная, Е Н Савенкова // Тепловодная аквакультура и биологическая продуктивность водоемов аридного комплекса. Международный симпозиум, 16-18 апреля 2007 материалы и доклады, АГТУ – Астрахань Изд-во АГТУ, 2007 – С 514–517

10 Федосеева, Е А Оценка физиологического состояния осетровых рыб при интенсивном выращивании / Е А Федосеева, С Ю Касаева, С С Астафьева // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов – 2 Расширенные мат-лы Межд науч - практ конф Борок – Москва, 17-20 июля 2007 – С 427–430

11 Касаева С Ю, Судакова Н В, Савенкова Е Н, Смирнов М Н, Островский М В Способ реабилитации рыб после хирургического вмешательства – Заявка на выдачу патента на изобретение №2007117985, приоритет от 28 апреля 2007

Издательство ФГУП «КаспНИРХ»
414056, г Астрахань, ул Савушкина, 1
Подписано в печать 27 09 2007 г
Тираж 100 экз Заказ 106