

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**им. М.В. ЛОМОНОСОВА**

**Биологический факультет**

**РГБ ОД**

**23 МАЙ 2002**

На правах рукописи

УДК 597-11

**КИТАШОВА Александра Анатольевна**

**РЕАКЦИИ ВРОЖДЕННОГО И ПРИОБРЕТЕННОГО  
ИММУНИТЕТА У РЫБ В ЕСТЕСТВЕННЫХ И  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ**

03.00.10 – ихтиология

14.00.36 – аллергология и иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Москва – 2002**

Работа выполнена на кафедре клеточной физиологии и иммунологии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: кандидат биологических наук  
доцент И.А. Кондратьева

Официальные оппоненты: доктор биологических наук  
профессор А.О. Касумян  
доктор биологических наук  
профессор В.Г. Галактионов

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский институт  
рыбного хозяйства и океанографии

Защита состоится 17 мая 2002 г. в 15 ч 30 мин на заседании диссертационного совета Д.501.001.53 в МГУ им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, ауд. 557.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан 17 апреля 2002 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук



Т.И. Куга

E074,0  
17836.325,0  
17410-242,0

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЛЕМЫ

**Актуальность проблемы.** Исследование организации и функционирования иммунной системы рыб и других низших позвоночных представляет собой важный аспект сравнительной и эволюционной иммунологии. У них представлены все формы иммунного ответа, как естественного, так и приобретенного, но они изучены неполно и целостной картины иммунореактивности рыб нет [Лукьяненко, 1989; Фонталли, 1998; Acton et al., 1971; Ellis, 1977; Lobb et al., 1984; Lie et al., 1989; Hart et al., 1998; Scapigliati et al., 1999; Secombes et al., 1999; Douglas et al., 2001]. Недостаточность знаний проявляется в противоречивости накопленных данных, обусловленной значительными различиями между классами и группами рыб, а также лабильностью их иммунитета и его чувствительностью к изменениям условий среды обитания [Кондратьева и др., 2001; Stave et al., 1985; Houghton et al., 1990; Sheldon et al., 1991; Espelid et al., 1996; Zelicoff et al., 2000].

Изучение иммунных механизмов рыб предоставляет материал для создания научной базы современного рыбоводства, являющегося неотъемлемым звеном экономического развития России. В последние годы исследования, связанные с рыбоводством, существенно расширились [Вихман, 1984; Сильченко и Попов, 1992; Криксунов и др., 1999; Кондратьева и др., 2002; Landolt, 1989; Lillehaug, 1989; Schreck et al., 1991; Sakai, 1999], но до сих пор отсутствует системный подход к изучению иммунитета рыб, ихтиопатологии и терапии рыб, и рыбные хозяйства несут большие экономические потери от смертности рыб вследствие болезней. Перспективными являются исследования воздействия на иммунный ответ рыб различных внешних факторов, а также разработка и производство простых в применении, надежных и высокочувствительных тест-систем для диагностики болезней рыб, создание эффективных вакцин и лекарственных препаратов.

Параметры иммунитета рыб используются в настоящее время как показатели загрязнения воды в реках, озерах и морях [Cossarini-Dunier et al., 1990; Hart, 1997; Aaltonen et al., 2000; Dethloff et al., 2001;

Regala et al., 2001]. Оценка иммунного статуса морских и пресноводных рыб позволяет получать достоверную информацию о состоянии животных в естественных условиях обитания и, как следствие, о качестве среды, а также проводить биотестирование и биомониторинг техногенного воздействия на водную среду обитания диких видов.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы явилось изучение реакций врожденного и приобретенного иммунитета рыб в норме и патологии в естественных и экспериментальных условиях. В качестве объектов исследования были выбраны радужная форель, широко используемая в аквакультуре, навага и треска — распространенные в Белом море виды рыб.

Были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать параметры врожденного иммунитета радужной форели, наваги и трески в норме и при патологии в зависимости от инфекции и зараженности паразитами.

2. Сравнить действие лекарственных препаратов в лечении энтерита радужной форели и выбрать наилучший класс терапевтических агентов.

3. Оптимизировать метод твердофазного иммуноферментного анализа и разработать экспериментальную тест-систему для изучения взаимодействия сывороток рыб с возбудителями заболеваний.

4. Выявить специфическое взаимодействие сывороток радужной форели с возбудителями энтерита с помощью разработанной тест-системы.

**Научная новизна работы.** Показано, что в сыворотке крови радужной форели, содержащейся в условиях прудового хозяйства, и тресковых рыб Белого моря присутствует активный лизоцим. Выявлена зависимость концентрации фермента от состояния рыб в норме и при патологии. Повышение концентрации лизоцима в результате паразитарной инвазии позволяет предположить существование новых, неизученных свойств этого белка. Результаты иммунохимиче-

ских исследований соответствуют данным клинических, патолого-анатомических, бактериологических и гематологических исследований. Сделано заключение, что параметры врожденного иммунитета, в частности лизоцим, являются надежными и достоверными показателями состояния рыб при инфекции и инвазии.

**Практическое значение работы.** Впервые проведено сравнение влияния различных лекарственных препаратов (нифулин, биовит-80, кормогризин-40 и бацилихин-120) в лечении энтерита молоди радужной форели. Наибольшее терапевтическое действие оказали нифулин в дозе 1 кг/т корма и биовит-80 в дозе 12,5 кг/т корма. Эти лекарственные препараты можно рекомендовать для лечения энтерита рыб в аквакультурах.

Впервые разработана и апробирована экспериментальная тест-система на основе метода твердофазного ИФА<sup>1</sup>, позволяющая определять в сыворотках рыб специфические антитела к возбудителям энтерита условно-патогенным сапрофитным микроорганизмам *Alcaligenes sp.* и *Citrobacter freundii* и диагностировать заболевание.

Полученные результаты позволяют рекомендовать показатели врожденного и приобретенного иммунитета рыб (концентрация белка и лизоцима в сыворотке крови, наличие специфических антител) в качестве биомаркеров для определения состояния организма рыб и, как следствие, качества среды обитания.

**Апробация работы.** Результаты работы были доложены на 12-й Европейской встрече иммунологов (Барселона, 1994), 9-м Международном иммунологическом конгрессе (Сан-Франциско, 1995), заседа-

<sup>1</sup> **Список сокращений и обозначений:**  $A_{492}$  — оптическая плотность при длине волны 492 нм; 2-МЭ — 2-меркаптоэтанол; БСА — бычий сывороточный альбумин; ДСН — додецил-сульфат натрия; ДЭАЭ — диэтиламиноэтил; ИФА — иммуноферментный анализ; ЛПС — липополисахарид; МПА — мясопептонный агар; МПБ — мясопептонный бульон; НАФ — неполный адьювант Фрейнда; ОФД — дигидрохлорид орто-фенилендиамина; ПЛАГ — полиакриламидный гель; ПАФ — полный адьювант Фрейнда; ПДГ — среда, содержащая пептон, дрожжевой экстракт и глюкозу; СОЭ — скорость оседания эритроцитов

нии Межведомственной ихтиологической комиссии РАСХН «Итоги научно-практических работ в ихтиопатологии» (Москва, 1997), Первой научной молодежной школе и конференции «Сохранение биоразнообразия и рациональное использование биологических ресурсов» (Москва, 2000), заседании кафедры клеточной физиологии и иммунологии МГУ им. М.В. Ломоносова (Москва, январь 2001), заседании лаборатории онтогенеза рыб кафедры ихтиологии МГУ им. М.В. Ломоносова (Москва, февраль 2001).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 185 страницах, иллюстрирована 21 рисунком и 11 таблицами.

В обзоре литературы изложены современные представления о структурно-функциональной организации иммунной системы рыб и регуляции ее действия. Рассмотрены основные заболевания рыб, методы профилактики и лечения заболеваний.

Список литературы содержит 329 источников.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объектами** исследования служили: радужная форель *Salmo gairdneri* (Richardson, 1836), северная навага *Eleginus navaga* (Pallas, 1811) и беломорская треска *Gadus morhua maris-albi* (Derjugin, 1920).

**Методы.** Форель содержали в рыбном хозяйстве «Бисерово» в долевых садках при температуре 14–16°C. Отлов наваги и трески производили ставными мережами, пойманную живую рыбу перевозили в емкостях с морской водой и непродолжительное время содержали в садках, подвешенных к плавучему причалу в море.

Первичные посевы микроорганизмов из кишечника и с жаберных лепестков рыб осуществляли на МПА, МПБ и ПДГ. При исследовании микроорганизмов морских рыб в среды добавляли NaCl (2%). Выделенные бактерии идентифицировали по результатам биохимических и морфологических исследований.

Паразитологические исследования проводили по стандартным методикам.

Взятие крови у форели проводили из хвостовой артерии, у трески и наваги — из сердца. Форменные элементы крови подсчитывали в камере Горяева. СОЭ, концентрацию гемоглобина и цветной показатель крови определяли по стандартным методикам.

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

Концентрацию лизоцима в сыворотках рыб определяли по методу Лабинской<sup>2</sup>. Сыворотки рыб разводили в 5,5 раз.  $A_{492}$  измеряли на однолучевом спектрофотометре Uvidesc4 фирмы Jasco при длине волны 540 нм через 15 и 180 с.

Фракцию иммуноглобулинов из сыворотки рыб и кролика осаждали насыщенным раствором сульфата аммония. IgM из сыворотки рыб очищали гель-фильтрацией на колонке с сефакрилом S300 (Pharmacia, Швеция), IgG из сыворотки кролика очищали на колонке с ДЭАЭ-сефарозой (Pharmacia, Швеция). Элюцию проводили 0–500 мМ раствором NaCl.

---

<sup>2</sup> Штаммы *Micrococcus lysodeikticus*, № 137, *Alcaligenes sp.*, № 260, *Citrobacter freundii*, № 244, и *Escherichia coli*, № 52, любезно предоставлены музеем микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд и спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

Для получения поликлональной антисыворотки иммунизацию кролика проводили троекратно иммуноглобулинами рыб: первый раз подкожно в четыре точки (400–500 мкг белка в ПАФ), через 45 дней внутрибрюшинно (та же доза белка в НАФ) и третий раз через 45 дней внутривенно (та же доза белка без адьюванта). Полученную антисыворотку прогревали при 56°C в течение 30 мин и истошали эритроцитами и клетками печени рыб по стандартной методике.

Твердофазный ИФА модифицировали на основе стандартной методики. Панели сенсibilизировали клетками бактерий *Alcaligenes sp.*, *Citrobacter freundii* и *Escherichia coli* в разведении 1:100 или разрушенными дезинтеграцией на ультразвуковом дезинтеграторе Branson 1 510 при 100 Вт в течение 2 мин при температуре 0°C бактериальными клетками в концентрации 10 мкг/мл. Поликлональные кроличьи антитела к иммуноглобулинам рыб вносили в концентрации 100 мкг/мл. Меченый конъюгат (сделан в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, серия 65) применяли в разведении 1:4 000. В качестве субстрата для ферментативной реакции использовали ОФД. Интенсивность окрашивания оценивали на вертикальном фотометре Multiscan фирмы Labsystems при длине волны 492 нм. Использовали оригинальное программное обеспечение, позволяющее получать в численном виде данные от фотометра и передавать их в электронные таблицы.

Данные исследований трески и наваги распределяли в интервальный вариационный ряд в соответствии с вариацией количества паразитов, приходящихся на одну особь. Число классов вычисляли по формуле Стерджеса. Достоверность полученных данных оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента ( $\alpha=0,05$ ).



## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование параметров врожденного иммунитета радужной форели, наваги и трески в зависимости от инфекции и зараженности паразитами. Известно, что стратегия защиты в организме рыб основывается на реакциях врожденного иммунитета, и прежде всего гуморального. Одним из важных компонентов гуморального врожденного иммунитета является лизоцим [Fletcher & White, 1973; Fonge et al., 1976; Ourth, 1980; Grinde, 1989; Lie et al., 1989]. Антибактериальные свойства лизоцима были продемонстрированы у многих видов рыб [Fletcher & White, 1973; Grinde, 1989; Kondratieva et al., 1995]. Основной функцией лизоцима, как считалось ранее, является уничтожение грамположительных бактерий в результате разрушения их клеточной стенки. Однако в последнее время обнаружено, что лизоцим обладает и другими свойствами: денатурированный нагреванием лизоцим способен разрушать грамотрицательные бактерии, он опосредованно стимулирует фагоцитарную активность макрофагов и нейтрофилов, обладает противовоспалительной и слабой хитинополитической активностью [Kokoshis & Di Luzio, 1979; Pellegrini et al., 1992; Takada et al., 1994]. Менее известны его функции при паразитарной инвазии.

В первой части работы исследовали показатели врожденного иммунитета рыб, и прежде всего лизоцим. Иммуные реакции при бактериальной инфекции изучали у радужной форели, содержащейся в условиях прудового хозяйства. Обычно промышленно разводимые рыбы характеризуются низкой зараженностью паразитами, но у них часты бактериальные инфекции из-за высокой плотности посадки рыб, нарушений температурных и иных условий содержания и воздействия стрессов, например из-за перевозки [Бауер и др., 1981; Кондратьева и др., 2002; Lillehaug A. 1989]. Врожденную иммунореактивность при паразитарной инвазии изучали у морских рыб в естественных условиях обитания (наваги и трески Белого моря). В этом случае инфекционные заболевания редки, однако паразиты являются ха-

актерными симбионтами морских рыб [Гиченок, 1996; Безгачина, 2000].

*Изучение иммунологических и гематологических показателей радужной форели при энтерите и исследование действия лекарственных препаратов.* В работе использовали двухлеток радужной форели массой 500–800 г, выращенных в рыбном хозяйстве «Волгореченское» и затем перевезенных в рыбное хозяйство «Бисерово», где рыб содержали при повышенной температуре (17–20°C) и недостаточности естественных кормов. У исследуемых рыб был ослаблен иммунитет, в кишечнике размножились условно-патогенные сапрофитные микроорганизмы (определенные как *Alcaligenes sp.* и *Citrobacter freundii*), и рыбы, в обычных условиях устойчивые к этим симбионтам, заболели энтеритом. Диагноз поставлен на основе данных клинического осмотра, патологоанатомического вскрытия, бактериологического, паразитологического и гематологического анализа. На основании этих данных заболевание отнесено к болезням смешанного типа с первичной бактериальной инфекцией.

Заболевших рыб (80 экземпляров) разделили на 5 групп по 15–17 особей. Здоровые рыбы (6-я группа) служили контролем. В течение недели рыб адаптировали к экспериментальным условиям, затем вместе с кормом рыбам давали лекарственные препараты, рекомендуемые специалистами для лечения энтерита рыб [Микитюк, 1984; Ковалев и др., 1989]. 1-я группа заболевших рыб получала комплексный препарат нифулин (1 кг/т корма); 2-я группа — антибиотик из группы тетрациклинов биовит-80 (12,5 кг/т корма); 3-я группа — препарат группы антибиотиков-стрептотрицинов кормогризин-40 (1,2 кг/т корма); 4-я группа — относящийся к группе полипептидов антибиотик бацилихин-120 (1,5 кг/т корма). 5-я группа лекарств не получала. Биовит, бацилихин и кормогризин давали в течение двух недель с двухдневным перерывом между неделями. Нифулин — в течение одной недели.

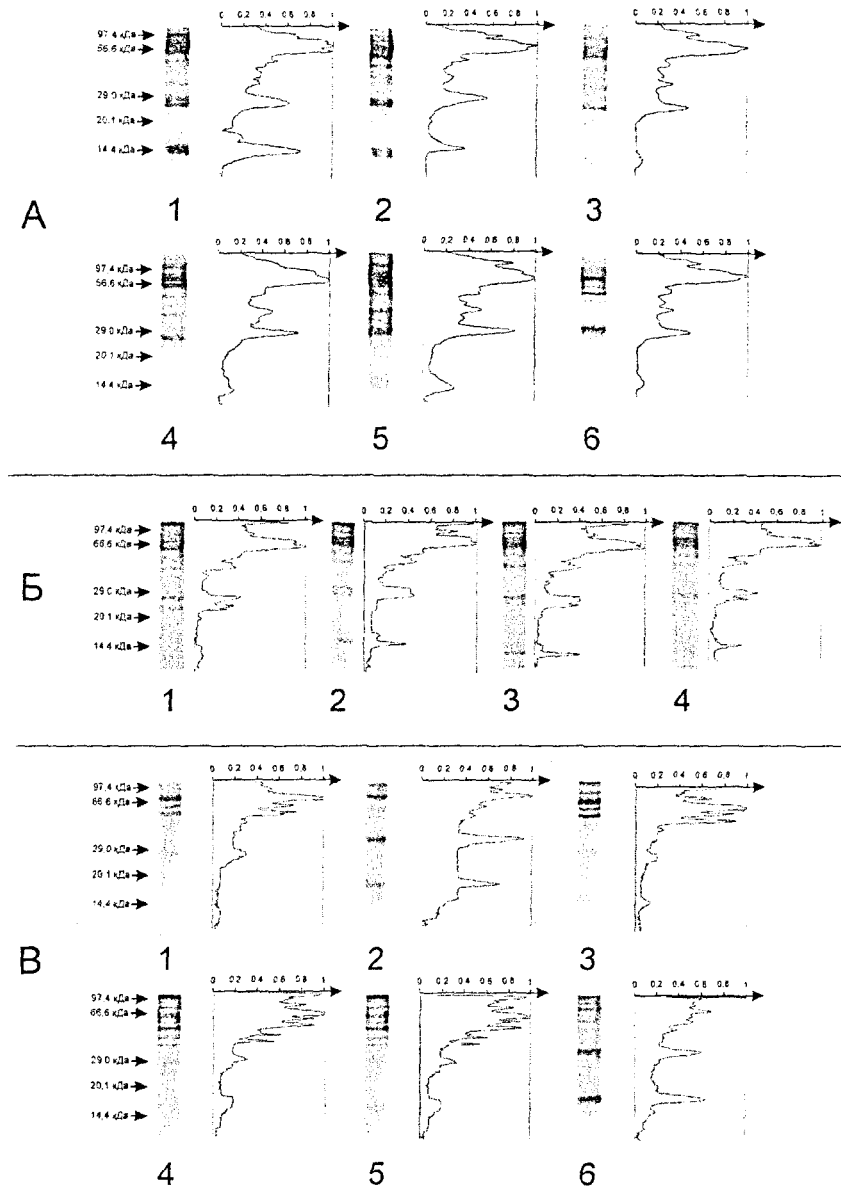
После лечения проводили клинический, патологоанатомический, бактериологический и паразитологический анализ, а также исследовали иммунологические и гематологические показатели. Данные табл. 1 подтверждают, что леченые рыбы были внешне практически здоровы (группы 1–4), у них улучшилось состояние кишечника и печени. В кишечнике леченых рыб уменьшилось вплоть до нормы количество бактерий, вызвавших заболевание (*Alcaligenes sp.* и *Citrobacter freundii*), на поверхности кожи не были выявлены эктопаразиты (*Argulus sp.* и *Diplostomum sp.*), обнаруженные у заболевших рыб до антибиотикотерапии (группа 5). Концентрация гемоглобина у леченых рыб соответствовала норме (83 г/л), тогда как у заболевших нелеченых рыб она равна 34 г/л. СОЭ также приблизилась к норме (7 мм/ч), у нелеченых рыб этот показатель равен 19 мм/ч. После терапии изменился белковый состав сыворотки крови рыб, появились новые фракции белка (рис. 1 А). Представленные данные, полученные разными методами исследования, полноценно отражают картину заболевания и лечения рыб.

Определение активности лизоцима показало, что уровень фермента в сыворотках радужной форели увеличился более чем в 2 раза (табл. 1), что соответствует данным литературы об активности лизоцима при бактериальных инфекциях [Fletcher & White, 1973; Grinde, 1989]. В зависимости от выбранного терапевтического агента концентрация лизоцима повышалась до 4,5–5,6 мкг/мл или понижалась до 1,9–2,1 мкг/мл.

Эффективность лекарственных препаратов различна: наибольший положительный эффект при лечении энтерита рыб проявили нифулин и биовит-80. Эти препараты можно рекомендовать для лечения энтерита при разведении рыб в рыбных хозяйствах.

Табл. 1. Клинические, патологоанатомические, бактериологические, паразитологические и гематологические показатели радужной форели

Группа	Клинический осмотр			Осмотр при вскрытии		Бактериологическое исследование		Сопутствующие паразиты		Гематологическое исследование		Концентрация лизоцима (мкг/мл)
	Состояние ануса (кол-во рыб, %)			Кишечник	Печень	«-» — отсутствуют; «+» — присутствуют в единичном количестве; «++» — присутствуют в большом количестве; «+++» — массовые колонии				Концентрация гемоглобина (г/л)	СОЭ (мм/ч)	
	Красный, припухлый	Красный	Норма			<i>Alcaligenes sp.</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Argulus sp.</i>	<i>Diplostomum sp.</i>			
1 Нифулин	0	0	100	Норма	Норма	+	-	-	-	88 ± 2	10 ± 1	5,6 ± 0,2
2 Биовит	0	30	70	Слабо воспален	Норма	+	+	-	-	89 ± 1	9 ± 1	4,5 ± 0,2
3 Кормогризин	29	30	41	Сильно воспален	Норма	-	++	+	-	91 ± 4	19 ± 4	1,9 ± 0,1
4 Бацилихин	10	40	50	Сильно воспален	Бледная, с красной каймой	++	+++	-	-	86 ± 1	9 ± 1	2,1 ± 0,1
5 Нелеченые	50	30	20	Сильно воспален	Глинистого цвета, с красным краем	+++	+++	+	+	34 ± 5	19 ± 5	3,3 ± 0,2
6 Здоровые	0	0	100	Норма	Норма	+	+	-	-	83 ± 2	7 ± 1	1,5 ± 0,1



**Рис. 1.** Двуступенчатый электрофорез сывороток крови рыб в ПААГ, содержащем ДСН, в восстанавливающих условиях. А — радужная форель, Б — навага, В — треска. Справа: усредненный для группы профиль оптической плотности электрофореграмм (по оси ординат указана относительная оптической плотности), слева: молекулярная масса, внизу: группы рыб.

*Исследование зависимости иммунологических и гематологических показателей наваги и трески от зараженности паразитами.* В ходе комплексного обследования наваги и трески Белого моря определяли морфологические параметры рыб, зараженность рыб паразитами, состав бактериальной флоры жабр рыб, гематологические, биохимические и иммунологические показатели и сравнивали их в норме и при инвазии. Рыбы (навага — 36 экземпляров, треска — 48 экземпляров) были разделены на группы в зависимости от интенсивности заражения скребнем *Echinorhynchus gadi* (Müller, 1776) (табл. 2).

Оба вида рыб являются основными дефицитивными хозяевами паразита. Экстенсивность инвазии исследуемой трески составила 97,9% при средней интенсивности инвазии 11,7 паразита на особь (табл. 2), а наваги — соответственно 52,8% и 1,4 паразита на особь. Выявлено, что интенсивность инвазии не зависит от длины и веса рыб (табл. 2). Это учитывали в ходе дальнейшей обработки данных.

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

У наваги и трески выделены три культуры бактерий: бактерии с жабр наваги отнесены к группе *Corynebacteria sp.*, а с жабр трески — к группам *Bacillus sp.* и *Pseudomonas sp.*

Табл. 2. Морфологические и паразитологические показатели наваги и трески

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

<sup>1</sup> Расстояние от переднего конца головы до конца хвостового плавника

<sup>2</sup> Расстояние от переднего конца головы до конца чешуйного покрова

<sup>3</sup> Масса рыбы

<sup>4</sup> Приведена для данной выборки

<sup>5</sup> Количество паразитов на особь

<sup>6</sup> Количество паразитов на 1 г тела особи хозяина

Табл. 3. Гематологические и иммунологические показатели наваги и трески

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



Установлено, что у зараженных паразитами наваги и трески в естественных условиях обитания изменились показатели врожденного гуморального иммунитета: на электрофореграмме сыворотки крови выявлены новые фракции белка (рис. 1 Б, В), в том числе низкомолекулярная фракция (около 14,5 кДа); в сыворотке существенно увеличилась общая концентрация белка (на 50% у наваги и почти вдвое у трески) и содержание лизоцима (в 5 раз у наваги и в 2 раза у трески). Как обсуждалось выше, лизоцим, помимо широко известной гликозидазной активности, субстратом для которой являются компоненты клеточной стенки бактерий, обладает и другими, не связанными с ферментативной активностью и неизученными в полной мере свойствами. Впервые обнаруженный рост концентрации лизоцима в зависимости от увеличения зараженности наваги и трески скребнем *Echinorhynchus gadi* можно объяснить следующим.

Во-первых, любая биологическая агрессия стимулирует у рыб одновременное развитие различных форм врожденного иммунного ответа, который проявляется в том числе и в увеличении концентрации лизоцима в сыворотках крови рыб. Однако если считать, что основная роль лизоцима в организме — борьба с микробной инфекцией, то в случае паразитарной инвазии эта реакция оказывается напрасной. Во-вторых, из литературы известно, что заболевание паразитами может, с одной стороны, повысить риск вторичной инфекции рыб и спровоцировать развитие заболеваний смешанного типа, а с другой стороны — активировать иммунные реакции [Васильков, 1999; Johansen & Sommer, 2001]. Роль лизоцима оказывается превентивной, направленной на возможное предотвращение вторичной инфекции. В-третьих, лизоцим может обладать и неизвестными в настоящее время свойствами, эффективными в борьбе с паразитами. В таком случае активация лизоцима позволяет рыбам повысить общую сопротивляемость организма инвазии.

Сравнение комплексных данных, полученных в первой части работы при изучении инфицированных бактериями рыб в экспери-

ментальных условиях (радужная форель) и незараженных и зараженных паразитами рыб в естественных условиях обитания (навага и треска), показало, что факторы врожденного иммунитета являются надежными и достоверными показателями состояния иммунитета рыб. Нарушение целостности внутренней среды организма рыб вследствие внешней агрессии стимулирует повышение концентрации белка, лизоцима в сыворотке крови рыб и появление новых белков. Отклонение этих показателей от нормы свидетельствует о патологическом состоянии животных. Увеличение содержания лизоцима при паразитарной инвазии позволяет предположить существование новых, неизученных свойств этого белка.

**Исследование специфического иммунитета рыб.** Определено, что у рыб, как и у высших позвоночных, специфические иммунные реакции осуществляются антителами [Shelton & Smith, 1970; Marchalonis, 1971; Marchalonis et al., 1992; Smith et al., 1993], но данные о роли антител в иммунном ответе у рыб противоречивы. Антитела разных видов костистых рыб обладают неодинаковыми биохимическими и физиологическими свойствами; концентрация антител у здоровых рыб зависит от вида, возраста, размера животных, внешних воздействий. Есть данные об отсутствии у рыб синтеза специфических антител при иммунизации ЛПС [Magnadottir et al., 2001] и отсутствии выраженного вторичного иммунного ответа и иммунологической памяти при иммунизации рыб препаратом из бактерий *Aeromonas hydrophila* [Lamers et al., 1985].

Во второй части работы экспериментально разработана тест-система на основе метода твердофазного ИФА, позволяющая определить наличие специфических антител в сыворотках рыб и диагностировать возбудителя заболевания. Тест-система апробирована для обнаружения специфических антител у рыб, заболевших энтеритом, вызванной условно-патогенными сапрофитными бактериями *Alcaligenes sp.* и *Citrobacter freundii*.

*Оптимизация метода твердофазного ИФА и экспериментальная разработка тест-системы для изучения специфического взаимодействия сывороток рыб с возбудителями заболеваний.* Использование метода твердофазного ИФА для выявления антител и характеристики реакций антигенраспознающей системы рыб, а также создание на его основе тест-систем для определения не диагностируемых клинически болезней и диагностирования заболеваний рыб на ранних этапах представляется перспективным благодаря высокой чувствительности и специфичности метода. Его методическая и техническая простота разрешает проводить в полевых условиях скрининг большого количества образцов сывороток рыб. Поскольку для проведения анализа требуется всего несколько микролитров сыворотки, диагностирование заболеваний у рыб можно проводить прижизненно.

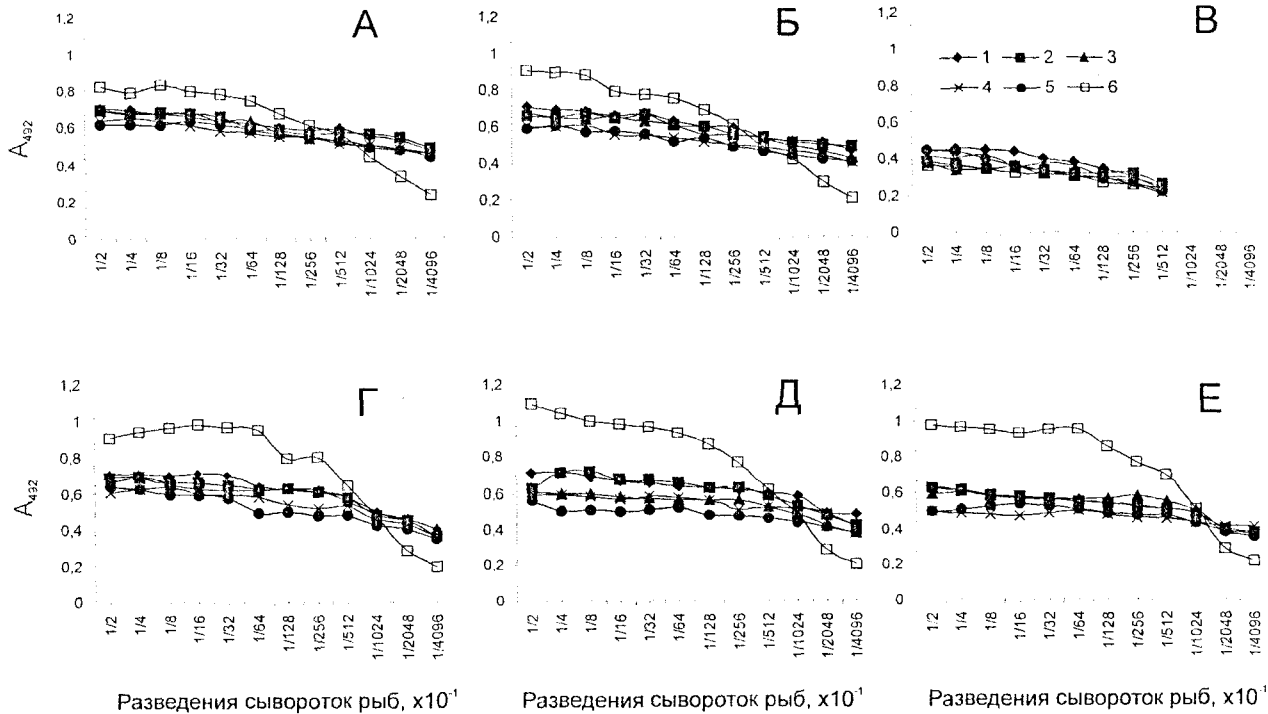
Задача подготовительного этапа работы состояла в получении поликлональных антител к иммуноглобулинам рыб. Для этого из сыворотки радужной форели выделили путем осаждения насыщенным раствором сульфата аммония и последующей гель-фильтрацией фракцию иммуноглобулинов, чистую по данным электрофореза в ПААГ. Количество белка составило около 350 мкг на 1 мл исходной сыворотки. Была подобрана схема иммунизации кролика для получения поликлональной антисыворотки к иммуноглобулинам рыб (см. методы). При иммунизации кролику ввели 1,5 мг иммуноглобулинов, что соответствовало 4 мл сыворотки рыб. Титр полученной антисыворотки составил более  $1,5 \times 10^5$ , значение фоновой реакции — 0,1–0,2. Из антисыворотки кролика выделили антитела к иммуноглобулинам рыб и использовали в дальнейшей работе.

Задача следующего этапа заключалась в выборе оптимальных условий проведения твердофазного ИФА. Определили: схему постановки анализа (непрямой твердофазный ИФА), оптимальное разведение конъюгата (1:4 000), оптимальную концентрацию иммуноглобулинов кролика (100 мкг/мл), сенсibilизирующих антигенов (разведение неразрушенных бактериальных клеток — 1:100, концентрация

разрушенных ультразвуком бактериальных клеток — 10 мкг/мл). На каждом этапе блокировали неспецифическое связывание с помощью БСА и использовали твин 80 при отмывании панелей.

*Применение метода твердофазного ИФА для определения специфического взаимодействия сывороток радужной форели с возбудителями энтерита.* Экспериментально разработанная тест-система была апробирована при обследовании радужной форели, заболевшей энтеритом. Использовали те же группы рыб, что и в первой части работы. В качестве антигена были выбраны возбудители заболевания — бактерии *Alcaligenes sp.* и *Citrobacter freundii*. Бактерии *Escherichia coli* присутствовали в бактериологических пробах в единичном количестве и были выбраны в качестве контроля. Бактерии использовали в неразрушенном и разрушенном ультразвуком виде для сравнения влияния поверхностных и внутриклеточных антигенов, а также для сравнения влияния размеров сенсibiliзирующих агентов.

На рис. 2 показано взаимодействие сывороток рыб с неразрушенными и разрушенными ультразвуком клетками бактерий. Для каждой серии, где сенсibiliзирующим антигеном являлись бактерии *Alcaligenes sp.* и *Citrobacter freundii* (графики А и Б), профиль кривых экспериментальных групп (1–5) и контрольной группы (6) совпадает. Вначале (разведение 1:20 – 1:5 120)  $A_{492}$  в лунках с сыворотками здоровых рыб выше, чем в лунках с сыворотками заболевших рыб. Затем значения  $A_{492}$  в лунках с сыворотками здоровых рыб резко снижаются, и при разведении 1:40 960 величина  $A_{492}$  падает до уровня реакции фона (0,2). В экспериментальных группах при разведении сывороток от 1:20 до 1:40 960  $A_{492}$  уменьшается в среднем на 0,2–0,3 единицы и при максимальном разведении значения  $A_{492}$  превышают реакцию фона в два раза. Разница в  $A_{492}$  лунок с сыворотками разных групп очень мала. График, полученный для серии, в которой сенсibiliзирующим антигеном служили бактерии вида *Escherichia coli* (В), отличается от первых двух тем, что лунки с образцами сывороток всех групп рыб показывают более низкую  $A_{492}$  как в начале (около 0,4 при



**Рис. 2.** Твердофазный ИФА сывороток крови рыб (1 — нифулин, 2 — биовит, 3 — кормогризин, 4 — бациллин, 5 — пелеченые, 6 — здоровые). А, Б, В: взаимодействие сывороток рыб с перазрушенными клетками бактерий (*Alcaligenes sp.*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* соответственно); Г, Д, Е: взаимодействие сывороток рыб с разрушенными клетками бактерий (*Alcaligenes sp.*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* соответственно)

разведении 1:20), так и при конечных разведениях (1:5 120), соответствующим значениям фоновой реакции. Реакция сыворотки здоровых рыб не отличается от реакции остальных групп рыб.

В ИФА, где сенсибилизирующим антигеном были разрушенные ультразвуком клетки бактерий, для трех серий экспериментов (графики Г, Д, Е) характер поведения кривых зависимости  $A_{492}$  от разведения сывороток в пределах групп одинаков и соответствует зависимости, полученной в экспериментах с неразрушенными бактериальными клетками видов, вызвавших заболевание (А и Б).

Таким образом, с помощью тест-системы показано, что сыворотки рыб специфично взаимодействуют с энтеропатогенными бактериями, вызвавшими заболевание (*Alcaligenes sp.* и *Citrobacter freundii*). Титр сывороток заболевших рыб выше, чем титр сывороток здоровых рыб ( $4 \times 10^4$ ). Это свидетельствует о наличии в сыворотках специфических антител к возбудителям энтерита. По-видимому, у здоровых рыб эти антитела обладают меньшей аффинностью по сравнению с антителами заболевших рыб. В связи с этим титр специфических антител у здоровых рыб невысок, и при разведении более  $5 \times 10^3$  наблюдается снижение до уровня фона значений оптической плотности. Специфические антитела заболевших рыб являются высокоаффинными, и обнаруживаются при разведении более  $4 \times 10^4$ . Отсутствие различий между результатами серий экспериментов, соответствующих разным видам бактерий, объяснимо тем, что в препаратах разрушенных бактериальных клеток доминирует общий для изученных бактерий антиген.

## ВЫВОДЫ

1. Лечение радужной форели, заболевшей энтеритом, лекарственными препаратами приводит к улучшению внешнего вида рыб, состояния кишечника и печени, уменьшению вплоть до нормы патогенных бактерий (*Alcaligenes sp.* и *Citrobacter freundii*) в кишечнике рыб и паразитов на поверхности кожи рыб (*Argulus sp.* и *Diplostomum sp.*), уменьшению скорости оседания эритроцитов, изменению белкового состава сыворотки крови и повышению концентрации гемоглобина и лизоцима в крови рыб. Наибольший положительный эффект в лечении энтерита рыб проявляют комплексный препарат нифулин в дозе 1 кг/т корма и антибиотик группы тетрациклинов биовит-80 в дозе 12,5 кг/т корма. Названные лекарственные препараты можно рекомендовать для лечения энтерита при разведении рыб в рыбных хозяйствах.

2. Заражение наваги и трески Белого моря скребнем *Echinorhynchus gadi* вызывает уменьшение содержания в крови форменных элементов и гемоглобина, повышение концентрации в сыворотке крови белка и лизоцима, появление в сыворотке новых фракций белка.

3. Оптимизирован метод твердофазного иммуноферментного анализа для определения специфического взаимодействия сывороток рыб с возбудителями заболеваний (подобраны концентрации антигена, антител и меченого конъюгата). На основе твердофазного иммуноферментного анализа экспериментально разработана и апробирована тест-система для диагностики заболевания рыб. Охарактеризован специфический иммунитет радужной форели к бактериям *Alcaligenes sp.* и *Citrobacter freundii*. Регистрируемое с помощью разработанной тест-системы увеличение в сыворотке крови рыб титра антител к микроорганизмам флоры кишечника позволяет определять патогены рыб.

4. Иммунологические параметры рыб (концентрация лизоцима, наличие специфических антител) могут служить биомаркерами в экспресс-тестировании состояния среды обитания рыб.

**По материалам диссертации опубликованы следующие работы:**

1. Naumova A.Ju., Kondratieva I.A., Kaigorodov V.A., Bolshakova A.A., Lashenkova N.N., Naumova A.M. 1994. The immunoreactivity stimulation in *Cyprinus carpio* and *Salmo gairdneri* by nonspecific agents. 12<sup>th</sup> European Immunology Meeting. Spain, Barcelona, June, 14–17. Abst. W47/31.

2. Kondratieva I.A., Bolshakova A.A., Chernousova L.N., Naumova A.V., Naumova A.M. 1995. Modulation of lysozyme activity in fishes by extracellular bacteria infection and by treatment with drugs. 9<sup>th</sup> International Congress of Immunology. USA, San-Francisco, July, 23–29. Abst. W76/4469.

3. Киташова А.А., Кондратьева И.А., Наумова А.Ю. 1997. Исследование белков сыворотки крови рыб в норме и при патологии с помощью ИФА. Межведомственная ихтиологическая комиссия, РАСХН, Итоги научно-практических работ в ихтиопатологии (информационный бюллетень). Москва, с. 61–63.

4. Киташова А.А., Кондратьева И.А., Наумова А.Ю. 2000. Модификация метода твердофазного иммуноферментного анализа для исследования сыворотки крови рыб. В сб. «Паразиты и болезни рыб». М: ВНИРО, с. 86–87.

5. Киташова А.А., Кондратьева И.А. 2000. Изучение влияния экологических условий на устойчивость молоди радужной форели *Oncorhynchus mykiss* Richardson к заболеваниям с помощью иммунологических методов. Тезисы Первой научной молодежной школы и конференции «Сохранение биоразнообразия и рациональное использование биологических ресурсов». Москва, 27–30 сентября, с. 50.

6. Кондратьева И.А., Киташова А.А., Ланге М.А. 2001. Организация, функционирование и регуляция иммунной системы рыб. Деп. в ВИНТИ 21.09.2001, № 2012-B2001.



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

8. Кондратьева И.А., Киташова А.А. 2002. Функционирование и регуляция иммунной системы рыб. Иммунология, №2, с. 97–102.

9. Кондратьева И.А., Киташова А.А., Наумова А.Ю. 2002. Действие лекарственных препаратов на молодь радужной форели. Вопросы рыболовства, №1 (9), с. 125–136.

*А. Киташова*

