

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

им. М.В. ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет

РГБ ОН

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; Фонталин, 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 молодой 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 ИФА¹, 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-

¹ **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 Лабинской². 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.

² 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

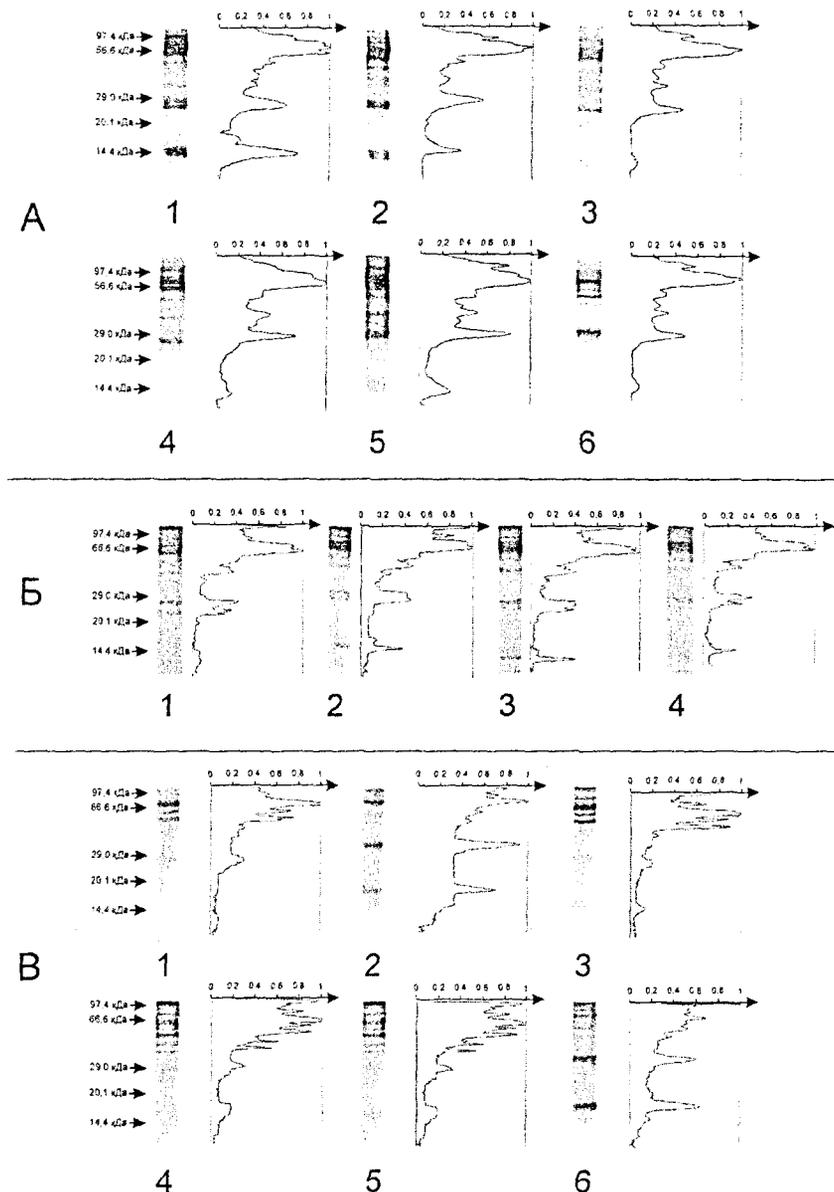


Рис. 1. Двуступенчатый электрофорез сывороток крови рыб в ПААГ, содержащем ДСН, в восстанавливающих условиях. А — радужная форель, Б — навага, В — треска. Справа: усредненный для группы профиль оптической плотности электрофореграмм (по оси ординат указана относительная оптической плотности), слева: молекулярная 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) ¹	l (см) ²	Q (г) ³	Экстенсивность инвазии ⁴	Интенсивность инвазии ⁵	Средняя интенсивность инвазии	Средняя удельная интенсивность инвазии ⁶
<i>Навага</i>							
1	22,7 ± 2,2	21,1 ± 1,8	92,1 ± 28,0	52,8%	0	0	0
2	22,6 ± 2,2	21,0 ± 2,1	95,7 ± 33,1		1	1	0,01
3	22,0 ± 0,89	20,7 ± 0,9	75,4 ± 9,5		2	2	0,02
4	27,5	25,8	148,2		4	4	0,03
<i>Треска</i>							
1	21,8 ± 4,3	20,0 ± 3,9	134,4 ± 36,4	97,9%	0-5	2,9	0,02
2	24,1 ± 4,2	22,8 ± 3,6	161,3 ± 51,6		6-15	10,4	0,07
3	26,7 ± 3,1	24,6 ± 2,8	202,3 ± 61,6		16-25	18,8	0,09
4	20,9 ± 1,9	19,7 ± 1,5	106,2 ± 17,8		26-35	26,5	0,25
5	24,5	22,5	137,7		36-45	36,0	0,26
6	30,2	28,1	315,0		56-65	65,0	0,21

¹ Расстояние от переднего конца головы до конца хвостового плавника

² Расстояние от переднего конца головы до конца чешуйного покрова

³ Масса рыбы

⁴ Приведена для данной выборки

⁵ Количество паразитов на особь

⁶ Количество паразитов на 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), сенсibiliзирующих 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

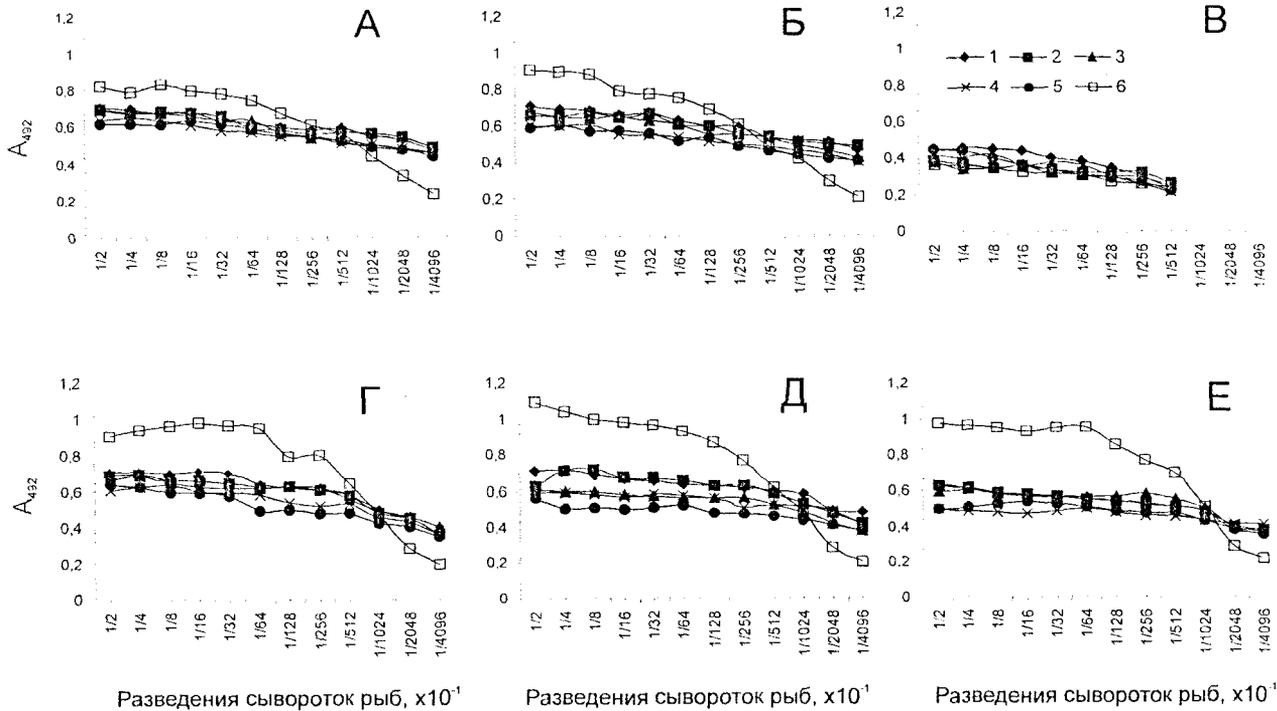


Рис. 2. Твердофазный ИФА сывороток крови рыб (1 — нифулин, 2 — биовит, 3 — кормогризин, 4 — бациллин, 5 — пелеченые, 6 — здоровые). А, Б, В: взаимодействие сывороток рыб с перазрушенными клетками бактерий (*Alcaligenes sp.*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* соответственно); Г, Д, Е: взаимодействие 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 (4×10^4). 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 5×10^3 наблюдается снижение до уровня фона значений оптической плотности. Специфические антитела заболевших рыб являются высокоаффинными, и обнаруживаются при разведении более 4×10^4 . 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. 12th 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. 9th 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

