

3

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет



005012524

Manf

Маклакова Мария Евгеньевна

**ИММУНО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС У РЫБ
ИЗ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ И АКВАКУЛЬТУРЫ
В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ**

03.02.06 – ихтиология

03.03.03 – иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

1 2 МАР 2012

МОСКВА – 2012

Работа выполнена на кафедрах иммунологии и ихтиологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Научные руководители: кандидат биологических наук, доцент
Кондратьева Ирина Анатольевна

доктор биологических наук, профессор
Касумян Александр Ованесович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Микодина Екатерина Викторовна
(Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва)

доктор биологических наук, профессор
Микряков Веннамин Романович
(Институт биологии внутренних вод имени И.Д. Папанина РАН, Борок, Ярославская обл.)

Ведущая организация: Институт водных проблем Севера Карельского научного центра РАН (Петрозаводск)

Защита диссертации состоится 23 марта 2012 года в 15 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д 501.001.53 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, по адресу: 119234 Москва, Ленинские Горы, 1, 12, МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, аудитория 557.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан «22» февраля 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Т.И. Куга

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время во многих развитых странах мира увеличивается производство продуктов питания, получаемых за счет аквакультуры. Масштабный рост искусственного выращивания рыб и других гидробионтов неизбежно сопровождается деградацией водных экосистем, вспышками массовых заболеваний среди культивируемых объектов и аборигенных представителей природных водоемов, усилением дестабилизирующего воздействия на рыб различных стрессовых факторов естественного и антропогенного происхождения (Наумова, 1991; Лукьяненко, Кулик, 1994; Буторина, 1997; Van der Oost, 1998; Грищенко и др., 1999; Карасева, 2001; Казимирченко, 2006; Мелехова и др., 2010; Lukin, 2011). В связи с этим особую актуальность приобретают исследования, направленные на выяснение закономерностей и особенностей естественных защитных функций организма рыб, к важнейшим из которых относится врожденная система иммунитета (Janeway, Medzhitov, 2002; Medzhitov, 2008; Ярилин, 2010). Изучение закономерностей ее функционирования и определение факторов, влияющих на иммуно-физиологический статус рыб, относится к одному из наиболее активно развиваемых направлений в физиологии рыб (Микряков и др., 1992, 2001; Балабанова, Степанова, 2000; Головин, Головина, 2001; Юхименко и др., 2005). Особый интерес представляет понимание пределов нормы иммуно-физиологического состояния рыб, находящихся под воздействием широкого спектра различных абиотических и биотических факторов, в том числе таких как паразитарные, бактериальные и вирусные инфекции (Cipriano, Shchelkunov et al., 2005; Казарникова, Шестаковская, 2005; Meijer, Spaank, 2011).

Важным, но остающимся слабо разработанным направлением современной иммунологии рыб, является поиск индикаторных характеристик, позволяющих оценивать иммуно-физиологический статус особи, проводить раннюю диагностику патологических состояний и восприимчивости рыб к заболеваниям, в том числе, к латентным формам инфекций (Anderson, 1990; Peakall, 1994; Bressler et al., 1999; Skouras, 2002; Verburg-van Kemenade, 2011). Разработка принципов и методов контроля здоровья рыб в природных водоемах и особенно для рыб, выращиваемых искусственным образом, создание новых или совершенствование существующих способов лечения рыб имеет важное прикладное значение. Широкое применение антибиотиков, используемых в аквакультуре для подавления инфекций и в профилактических целях, не всегда дает желаемый эффект (Киташова и др., 2002; Егоров, 2004; Samanidou, Evaggelopoulou, 2007). Многими авторами отмечено иммуносупрессивное действие антибиотиков на больных рыб (Zelikoff, 1994; Кондратьева, Киташова, 2002; Sağlam, Yonar, 2009). Недостаточно изучено влияние лекарственных препаратов на иммуно-физиологическое состояние здоровых рыб (Rodgers, 1991; Maqsood et al., 2009). Отсутствуют сведения о хемосенсорных свойствах антибиотиков и их влиянии на вкусовую привлекательность лечебных и профилактических кормов для рыб.

В связи с вышесказанным представляется актуальным изучение закономерностей формирования клеточного и гуморального ответа врожденного иммунитета у рыб в норме и находящихся под влиянием разнообразных факторов естественного и искусственного происхождения.

Цель работы – установить особенности иммуно-физиологического статуса рыб из природных популяций и содержащихся в искусственных условиях при поражениях различной этиологии, выяснить хемосенсорные свойства антибиотиков и их влияние на рыб.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

- определить у рыб из природных водоемов и аквакультуры иммуно-физиологические параметры в норме и при поражениях различной этиологии (паразитарные, вирусные, бактериальные и смешанные инфекции)
- установить гематологические индикаторы иммуно-физиологического состояния рыб
- выяснить влияние антибиотиков на иммуно-физиологическое состояние здоровых рыб
- оценить вкусовые свойства антибиотиков и их влияние на пищевое поведение рыб

Научная новизна. Впервые определены доминирующие аэробные виды бактерий у трески *Gadus morhua maris-albi* и наваги *Eleginus navaga* Белого моря. Установлена возможность оценки иммуно-физиологического статуса рыб по электрофоретическому анализу соотношения белковых фракций в сыворотке крови и по лейкограмме. Впервые продемонстрировано, что антибиотики бензилпенициллин и окситетрациклин вызывают у здоровых особей радужной форели *Parasalmo (=Oncorhynchus) mykiss* нейтропению, элиминируют альбуминовую фракцию в сыворотке крови, индуцируют появление липоидных скоплений и других патологий внутренних органов. Это негативное влияние зависит от длительности их применения. Негативное влияние антибиотиков зависит от длительности их применения. Впервые обнаружено, что антибиотики обладают для рыб привлекательными (окситетрациклин в высокой концентрации и неомицин в широком диапазоне концентраций) или отталкивающими (бензилпенициллин в высокой, а окситетрациклин в низкой концентрации) свойствами.

Практическая значимость работы. Подготовлены научно-практические рекомендации по диагностике иммуно-физиологического статуса рыб для специалистов ихтиопатологов и рыбоводов. Полученные результаты используются в лекционных курсах на биологическом факультете МГУ имени М.В.Ломоносова.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Рыбы из природных популяций и не имеющие внешних клинических проявлений заболевания могут быть носителями возбудителей паразитарных и бактериальных инфекций. Особи с минимальным

количеством паразитов во внутренних органах имеют нормальные показатели лейкограммы и содержания сывороточных белков крови.

2. Фракционный состав белков сыворотки крови и лейкограмма являются индикаторами иммуно-физиологического состояния рыб.

3. Длительное применение антибиотиков ухудшает иммуно-физиологическое состояние здоровых рыб.

4. Антибиотики обладают для рыб выраженными вкусовыми свойствами и влияют на их пищевое поведение.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на Международной научной конференции «Физиология микроорганизмов в природных и экспериментальных системах» (Москва, 2006, 2009); на Российском иммунологическом форуме (Санкт-Петербурге, 2008); на двусторонней конференции Россия – США по здоровью гидробионтов (Шеффердстон, Западная Вирджиния, 2009); на открытых заседаниях Научно-консультативного совета по болезням рыб ФГУ «Межведомственная ихтиологическая комиссия» (Москва, 2009, 2010); на совместном заседании кафедр ихтиологии и иммунологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова (Москва, 2012).

Публикации. Основные положения диссертации изложены в 8 печатных работах, в том числе в 5-и ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 152 страницах печатного текста, включает 8 таблиц, 28 рисунков. Состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов), заключения, выводов и списка цитируемой литературы, который включает 298 источников, из них 188 – на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает благодарность за помощь в получении и обработке результатов Г.А. Дольниковой, Е.А. Завьяловой, Е.А. Марусову, Г.Г. Миллер, Е.С. Михайловой, Т.Д. Пичугиной; за постоянные консультации А.В. Киташову, А.М. Наумовой; сотрудникам кафедры иммунологии, ихтиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко, лаборатории ассоциированных инфекций ГУ НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи за поддержку на всех этапах работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе представлены современные сведения об иммунной системе рыб, о чувствительности показателей врожденного иммунитета (клеточный и белковый состав крови) к воздействию разнообразных факторов окружающей среды (температура воды, условия обитания, кормовая база, наличие загрязнений). Отражено использование рыб как модельного объекта в изучении общих закономерностей врожденного и приобретенного иммунитета.

Рассмотрены бактериальные, вирусные и паразитарные инфекции рыб и их влияние на иммуно-физиологическое состояние особей. Кратко проанализированы методы борьбы с инфекциями в условиях аквакультуры и хемосенсорные эффекты различных добавок в корма для рыб.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная часть работы выполнена на кафедрах иммунологии, ихтиологии и на Беломорской биологической станции биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова (ББС МГУ), во Всероссийском институте экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко (ВИЭВ) и в ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи (ГУ НИИЭМ) в период с 2006 по 2011 гг.

Объектами исследования служили: беломорская треска *Gadus morhua maris-albi* (30 особей), навага *Eleginus navaga* (22 особей) (из Кандалакшского залива Белого моря), карп *Cyprinus carpio* (70 особей из трех подмосковных рыбоводческих хозяйств), радужная форель *Parasalmo (=Oncorhynchus) mykiss* (45 особей из Всероссийского научно-производственного объединения по рыбководству, пос. Рыбное, Московская обл.), перевиваемая культура клеток карпа ЕРС (ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко).

Таблица 1. Общая характеристика объема работы.

Метод исследования	Число исследований или образцов				
	1 этап работы	2 этап работы	3 этап работы	4 этап работы	Всего
Патологоанатомический	52	70	30	-	152
Лейкограмма	52	70	30	-	152
Электрофорез сыворотки крови	104	140	60	-	304
Паразитологический анализ органов брюшной полости	52	70	30	-	152
Взятие проб для микробиологического анализа	156	210	-	-	366
Культивирование и идентификация бактерий	260	420	-	-	680
Взятие проб для вирусологического анализа	-	70	-	-	70
Выявление вируса в клетках ЕРС	-	70	-	-	70
Электронная микроскопия	-	100	-	-	100
Влияние антибиотиков на состояние здоровых рыб	-	-	120	-	120
Оценка вкусовой привлекательности антибиотиков	-	-	-	1400	1400

Перед вскрытием у рыб брали кровь для получения сыворотки (Кондрачева, Ярилин, 2004). Для определения лейкоцитарной формулы делали мазок крови и окраску по Романовскому-Гимза (Житенева и др., 2004). Электрофорез сыворотки крови проводили по модифицированному для рыб методу Laemmli в денатурирующих условиях (Клаус, 1990). Электрофореграммы обрабатывали с помощью компьютерной программы Total Lab Quant v12.2.

При патоморфологическом исследовании оценивали состояние внешних покровов рыб, внутренних органов по их размерам, окраске, наличию гиперемии, изменению консистенции, присутствию липоидных скоплений и фибринозных воспалений (Карташев и др., 1981; Грищенко и др., 1999).

Первичные посевы микроорганизмов из смывов с поверхности тела, жабр и кишечника рыб осуществляли по стандартной методике. После получения чистых культур, выделенные бактерии идентифицировали по биохимическим и морфологическим признакам (Берджи, 1997). Сбор многоклеточных паразитов производили в органах брюшной полости (Быховская-Павловская, 1985). Вирус весенней виремии карпа выделяли из внутренних органов (печень, почки, селезенка) (Pichugina et al., 2003). Полученный вирус в супернатанте вносили в культуру клеток ЕРС для заражения (Щелкунов и др., 2004). Для идентификации вируса и для изучения его действия на клетки использовали метод электронной микроскопии (Granzow et al., 2001).

Вкусовую привлекательность терапевтических агентов и особенности пищевого поведения оценивали по реакции одиночных подопытных особей радужной форели на агар-агаровые гранулы (2%), содержащие краситель (Ponceau 4R, 0.0005 M) и одно из использованных веществ – натриевую соль бензилпенициллина, гидрохлорид окситетрациклина, цефазолин-акос или сульфат неомицина в концентрации 1, 10 и 100 мг/мл (Касумян, Сидоров, 1994).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

3.1. Исследование иммуно-физиологического статуса трески и наваги.

Исследовали треску и навагу, выловленную в Белом море около ББС в августе 2008, 2009 гг. Подвергнутые анализу особи были внешне клинически здоровы. При вскрытии обнаружили множественные патологии внутренних органов, которые оценивали в соответствии с принятыми рекомендациями по ихтиопатологическому анализу (Грищенко и др., 1999).

Основными патологиями у рыб были фибринозное воспаление, нарушение кровоснабжения внутренних органов (желудка, печени, пилорических придатков, кишечника), изменения консистенции органов (пилорических придатков, селезенки, печени), в некоторых случаях наблюдали набухание туловищной почки (Рис. 1, 2). Наиболее часто у трески встречались патологии печени и кишечника, у наваги – печени, пилорических придатков и селезенки (Рис. 3).

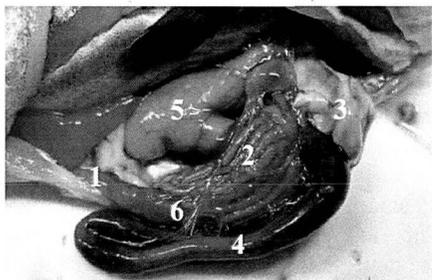


Рис. 1. Патологии внутренних органов трески. 1 – гиперемия и отечность кишечника; 2 – гиперемия и пониженный тургор пилорических придатков; 3 – геморагии печени; 4 – многоклеточные паразиты; 5 – гиперемия желудка; 6 – фибринозное воспаление.

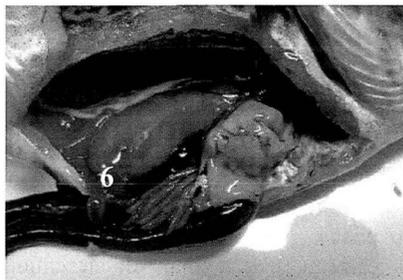


Рис. 2. Патологии внутренних органов наваги. 1 – гиперемия и отечность кишечника; 2 – пониженный тургор пилорических придатков; 3 – геморагии, изменение цвета и консистенции печени; 4 – дряблость селезенки; 5 – многоклеточные паразиты; 6 – фибринозное воспаление.

При вскрытии в органах брюшной полости были обнаружены гельминты следующих видов: скребень *Echinorhynchus gadi*, нематоды *Anisakis simplex*, *Hysterothylacium aduncum gadi*, трематода *Pyramicocephalus phocarum*, цестода *Bothriocephalus acheilognathi*. Экстенсивность инвазии трески (отношение числа зараженных особей к общему количеству рыб) составила 87%, наваги – 91%. Интенсивность инвазии (число паразитов на особь) у трески была ниже, чем у наваги (Рис. 4).

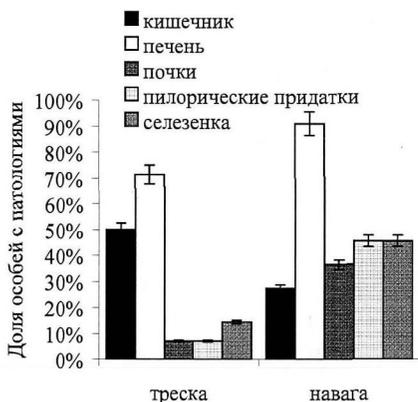


Рис. 3. Частота встречаемости патологий внутренних органов у трески и наваги,

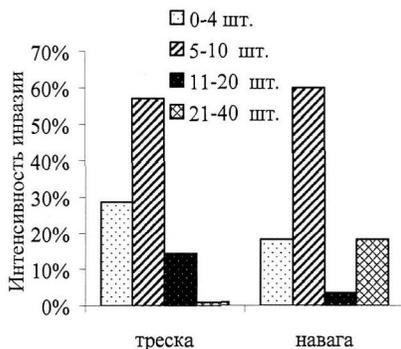


Рис. 4. Распределение рыб по совокупной численности гельминтов в

имеющих многоклеточных паразитов. органах брюшной полости.

На жабрах и поверхности тела были выявлены представители следующих родов: грамотрицательные *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Cytophaga*, *Deleya*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio* и грамположительные *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Marinococcus*.

В кишечнике обоих видов основными доминирующими родами были *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Corynebacterium*, *Photobacterium*, *Vibrio*, оксидазо- и каталазоположительные, в меньшей степени были представлены *Bacillus*, *Marinococcus*, *Micrococcus*, *Deleya*, *Bacillus*, *Aeromonas*.

При усилении инвазии у трески и наваги в лейкограмме увеличивается доля незрелых форм клеток – лейкобластов, и эозинофилов (Рис. 5), которые, как известно, в основном участвуют в противопаразитарном иммунитете (Ярилин, 2010; Meijer, Spaink, 2011). Полученные данные свидетельствует об изменении темпов кроветворения и направленности процессов клеточной дифференцировки в сторону усиления гранулоцитопоэза.



Рис. 5. Относительное число различных форм лейкоцитов (в %) в крови трески и наваги, имеющих разное количество многоклеточных паразитов.

Для анализа электрофоретического профиля белков сыворотки крови (Рис. 6) фракции условно были разделены на 3 группы (Рис. 7). Глобулины – самые тяжелые белки (от 66 kDa и выше), в свою очередь были разделены на α -, β - и γ -фракции. К α -фракции относятся белки, участвующие в воспалении, такие как белки острой фазы, С-реактивный белок, сывороточный амилоид Р (Ярилин, 2010); к γ -фракции относятся антитела класса IgM. К альбуминам (от 20 до 65 kDa) – белки системы комплемента. К преальбуминам (менее 20 kDa) относится, в частности, лизоцим – фермент, способный лизировать клеточную стенку грам-положительных бактерий. У трески с 10 гельминтами повышается уровень преальбуминов и α -фракции, снижается уровень альбуминов. У трески и наваги с максимальным количеством паразитов снижается интенсивность

всех фракций. Этот эффект вызван поражением основных органов (печень, почки, селезенка), где происходит синтез белков, необходимых для врожденного иммунитета, таких как белки системы комплемента, белки острой фазы воспаления, ферменты и кофакторы противопаразитарного и противобактериального иммунного ответа.

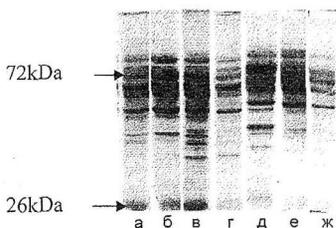


Рис. 6. Электрофореграммы сыворотки крови трески и наваги. а — треска без паразитов; б — треска с 5 паразитами; в — треска с 10 паразитами; г — треска с 20 паразитами; д — навага с 5 паразитами; е — навага с 10 паразитами; ж — навага с 30 паразитами.

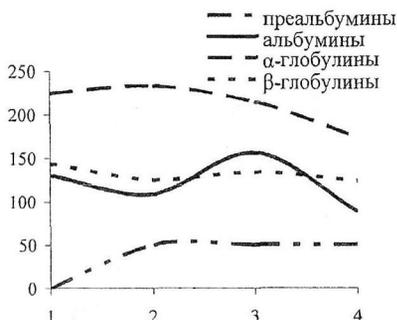


Рис. 7. Усредненный график изменения основных фракций белков сыворотки крови трески и наваги. По оси ординат средняя интенсивность фракции. По оси абсцисс 1 — 0-5 паразитов, 2 — 10 паразитов; 3 — 20 паразитов; 4 — 30 паразитов.

Повышенная температура воды в период проведения исследований (в августе наблюдается среднегодовой максимум температуры в Белом море), по-видимому, отрицательно влияла на состояние особей, так как практически все особи были заражены многоклеточными паразитами и условно патогенными бактериями. В этом случае пределами нормы является наличие менее 10 гельминтов на особь, поскольку у таких рыб не выявлено существенных изменений в лейкограмме и профиле белков сыворотки крови, по сравнению с незараженными особями. Более высокие значения инвазии приводит к патологиям внутренних органов, изменению белкового профиля и соотношения лейкоцитов, что отражает снижение иммунитета и как следствие ведет к снижению резистентности организма к инфекциям.

3.2. Исследование иммуно-физиологического статуса карпа при бактериальной и вирусной инфекциях.

Для изучения влияния бактериальных и вирусных инфекций на иммуно-физиологический статус рыб было проведено исследование карпов при

пересадке в нагульные пруды весной, когда часто наблюдаются вспышки вирусных и бактериальных инфекций, которые приводят к массовой гибели рыб. Отбирали карпов с внешними клиническими признаками вирусной весенней виремии карпа (группа 1, Рис. 8) и аэромоноза (группа 2, Рис. 9). Карпы группы 3 были внешне здоровы.

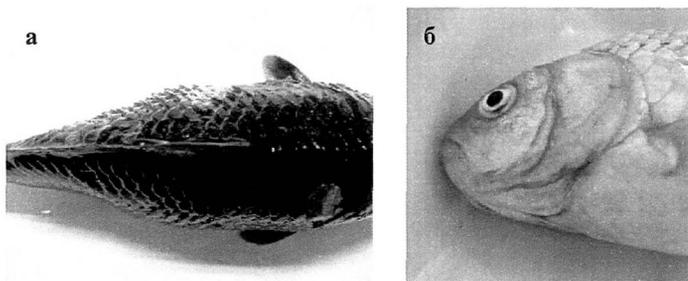


Рис. 8. Внешние признаки весенней виремии карпа (группа 1): ерошение чешуи (а) и гиперемия на жаберных крышках (б)

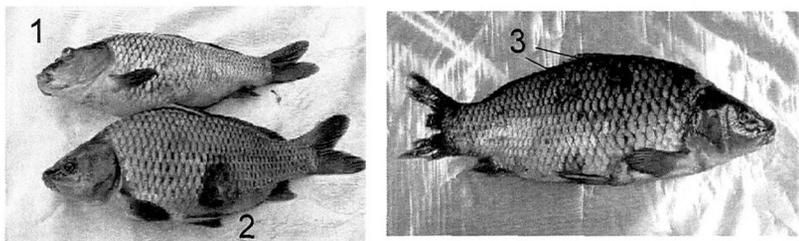


Рис. 9. Внешние признаки аэромоноза (группа 2): 1 – экзофтальмия; 2 – язвы на поверхности тела; 3 – геморрагии на поверхности тела.

У рыб группы 1 при вскрытии было обнаружено небольшое увеличение почки и селезенки, изменение плавательного пузыря типичного для хронической стадии воспаления плавательного пузыря. Диагноз был подтвержден вирусологическим исследованием в лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко и электронно-микроскопическим исследованием в лаборатории ассоциированных инфекций НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи.

У карпов группы 2 наблюдали при вскрытии у всех особей присутствовало фибринозное воспаление внутренних органов, почка и селезенка были дряблые, увеличены, неравномерно окрашены, желудочно-кишечный тракт не содержал кормовых масс, плавательный пузырь был мутный, задняя камера была искривлена и гиперемирована, в полости тела и в подчешуйных карманах скопился кровянистый экссудат. Описанные изменения плавательного пузыря типичны для хронической формы воспаления

плавательного пузыря. Диагноз был подтвержден микробиологическим исследованием и биопробой в лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ им. Я.Р.Коваленко.

Рыбы группы 3 не имели внешних признаков патологий. Однако, при патоморфологическом исследовании у этих рыб обнаружили воспаление плавательного пузыря в завершающей стадии и ожирение разной степени. Внутренние органы имели пониженный тургор, часто были увеличены. У трети рыб печень была зеленого цвета, что свидетельствовало об аутоинтоксикации. У всех особей желчный пузырь был переполненный, воспаленный и отечный кишечник без пищи. Такие признаки наблюдаются при размножении условно-патогенной микрофлоры, например, при аэромонозе, и при использовании корма с истекшим сроком годности. У части рыб селезенка имела очень почти черный цвет и была увеличена. Почки у всех рыб были дряблыми.

В качестве контроля брали карпов из благополучного по заболеваниям хозяйства, у которых не было обнаружено внешних или внутренних патологий (Рис. 10, 11e).

Рыбы с бактериальной и вирусной инфекциями отличались по лейкоцитарной формуле (Рис. 10). При бактериальной инфекции возрастает относительное содержание нейтрофилов и лейкобластов, что говорит о воспалении.

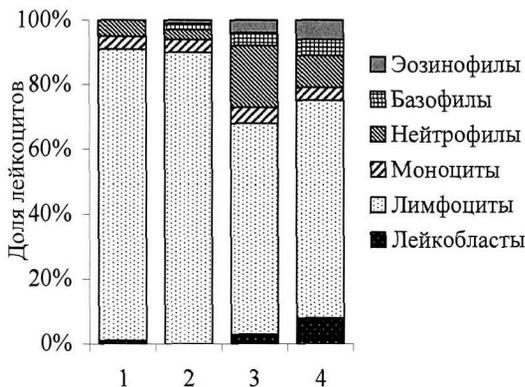


Рис. 10. Относительное число различных форм лейкоцитов (в %) в крови карпов.
1 – контроль;
2 – вирусная инфекция;
3 – бактериальная инфекция;
4 – смешанная инфекция.

При исследовании профиля сыворотки крови рыб групп 1 и 2 были обнаружены характеристические отличия между бактериальной и вирусной инфекциями (Рис. 11). При вирусной инфекции у рыб была повышена интенсивность глобулинов, которые возрастают при септических процессах, острой инфекции, при токсических эффектах. При бактериальной были увеличены фракции альбуминов и преальбуминов, которые участвуют в противобактериальном иммунитете.

У рыб группы 3 наблюдалось присутствие обоих типов изменений профилей сывороточных белков, что позволило предположить смешанную инфекцию. Этот диагноз затем был подтвержден микробиологическим исследованием – посевами на селективные среды и идентификация аэромонад.

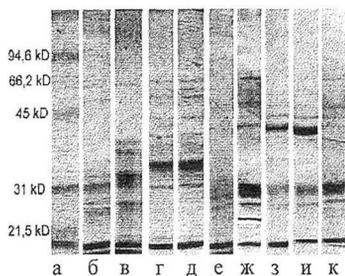


Рис. 11. Электрофореграммы сыворотки крови карпов.
а — стандартный маркер
б,в — аэромоноз
г,д — весенняя вирусия карпов
е — контроль
ж-к — смешанная инфекция

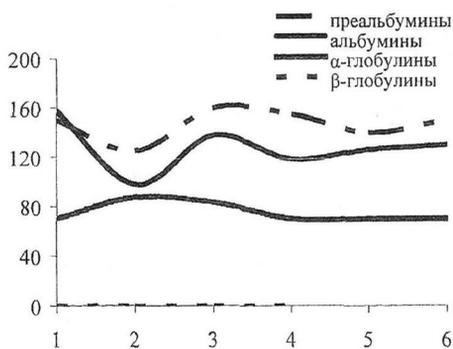


Рис. 12. Усредненный график изменения основных фракций белков сыворотки крови карпов. По оси ординат средняя интенсивность фракции. По оси абсцисс 1 — контроль; 2 — весенняя вирусия карпа; 3 — аэромоноз; 4-6 — смешанная инфекция.

Вирусологические исследования были проведены на перевиваемой линии клеток ЕРС, изучали цитопатогенное действие вирусного агента. Полная деградация монослоя клеток развивалась в течение трех дней. Все этапы морфогенеза SVCV можно проследить на ультратонких срезах разных участков цитоплазмы инфицированных клеток через 48 часов от момента заражения (Рис. 13, 14, 15).

Одним из наиболее заметных признаков заражения рабдовирусами, который был показан в данной работе, является появление в клетках концентрических пластинчатых структур (ПС2), на которых, вероятно, идет синтез гликопротеина (G) оболочки вириона. Были также обнаружены пластинчатые структуры (ПС1), схожие с образованиями, свойственными опухолевым клеткам теплокровных.

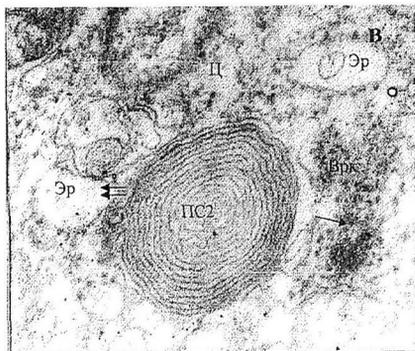
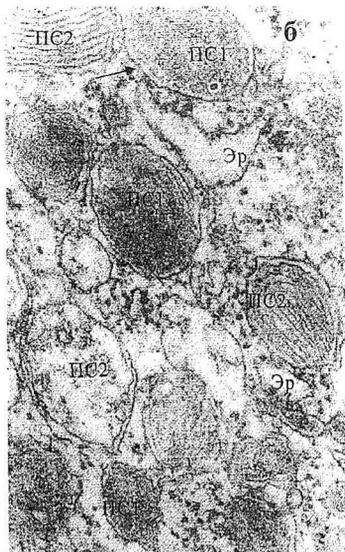
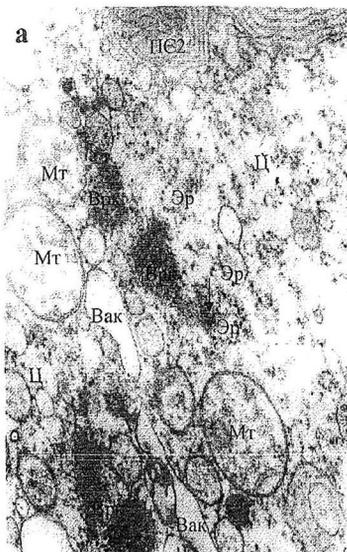


Рис. 13 а-в. Клетка ЕРС, инфицированная SVCV. Инструментальное увеличение 25000х.

Обозначения к рис. 13а-в:
 Ц – цитоплазма; Эр – гранулярный эндоплазматический ретикулум; Врк – вирус-репликативный комплекс; ПС1 – пластинчатые структуры первого морфологического типа; ПС2 – пластинчатая структура второго типа; Р – рибосома; Я – ядро; Мт – митохондрии; стрелками указана связь ПС2 с Врк и Эр.

Взаимодействие вируса и клеток характеризовалось также разрушением либо беспорядочным ориентированием крист митохондрий и большим количеством лизосом. Репликация вируса SVCV происходит в цитоплазме, соответственно вирус-репликативные комплексы располагались в цитоплазме в окружении свободных рибосом, рядом с пластинчатыми структурами ПС2. Было показано почкование вирионов на поверхности клетки и в вакуолях, располагающихся рядом с плазматической мембраной. Размер вириона SVCV – 120-125X75-80 нм, внутренний канал (40-42 нм).

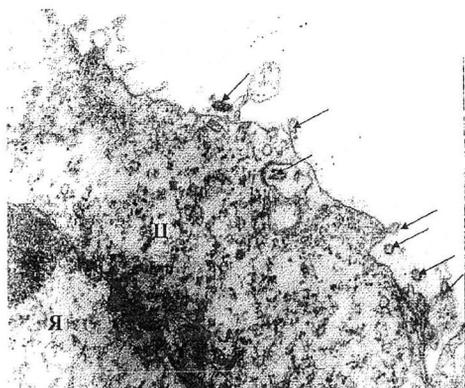


Рис. 14. Фрагмент клетки EPC с почкующимися вирионами SVCV (указаны стрелками). Инструментальное увеличение 17500х. Обозначения: Я – ядро клетки EPC; Ц – цитоплазма.

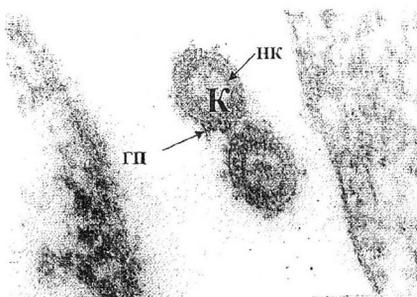


Рис. 15. Поперечный срез вирионов SVCV. Инструментальное увеличение 30000х. Обозначения: К – внутренний канал вириона; НК – нуклеокапсид; ГП – поверхностный гликопротеин.

3.3. Воздействие инъекций антибиотиков на иммуно-физиологический статус радужной форели

Антибиотики способны не только осуществлять прямую функцию – бактериолизическую или бактериостатическую, но и также действовать на иммунологические и физиологические показатели рыб. Даже правильно подобранный антибиотик способен вызывать патологии внутренних органов и угнетать иммунную систему. В задачи нашей работы входило выяснение как антибиотики влияют на иммуно-физиологический статус здоровых рыб. Эта часть работы выполнена на радужной форели.

Были использованы наиболее распространенные в ветеринарии антибиотики широкого спектра действия – натриевую соль бензилпеницилина, и гидрохлорид окситетрациклина, активные как против грамположительных, так и грамтрицательных бактерий. Для точного расчета дозы полученного рыбой вещества были выбраны инъекции в брюшную полость. Антибиотики разводили раствором Рингера для холоднокровных животных из расчета 2 мг/кг. Суммарный объем инъекции на особь не превышал 100 мкл. Перед введением рыбу взвешивали. Контрольной группе вводили раствор Рингера для холоднокровных. В каждой группе проводили 3 или 5 инъекций.

На протяжении всего опыта интактные особи проявляли обычное поведение: рыбы были активны, располагались по всему объему аквариума, охотно питались предлагаемым кормом. При патоморфологическом исследовании каких-либо внешних отклонений внутренних органов от нормы у рыб этой группы не выявлено, этот уровень принят за нулевой. За норму принята также и формула лейкоцитов крови интактной группы.

Уже после 3-х инъекций лекарственных препаратов наблюдали патологии внутренних органов, хотя внешние проявления были нормальными. После 5 инъекций была другая картина. Действие антибиотиков становится генерализованным, т.е. охватывает практически все органы (рис. 16, 17). В лейкограмме наблюдается нейтропения, т.е. снижение количества нейтрофилов (рис. 18). Это фагоцитирующие клетки, представляющие первую линию защиты, участвуют в узнавании. Компенсаторно увеличивается количество моноцитов. Снижается количество незрелых форм, что может свидетельствовать о нарушении гемопоэза.

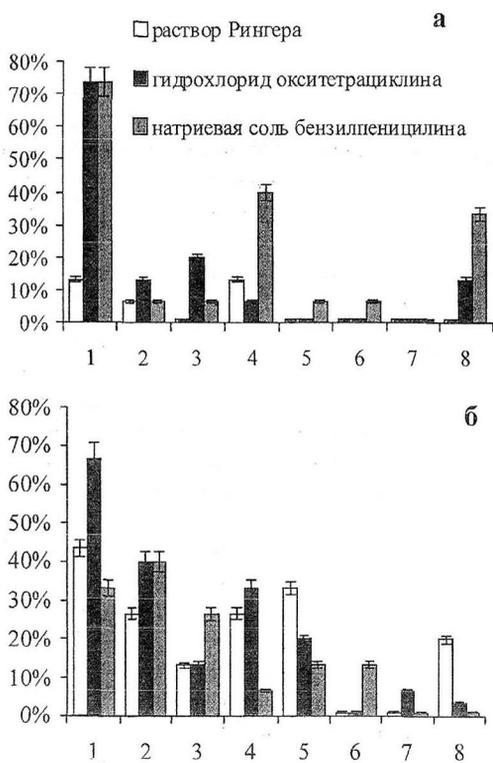


Рис. 16. Выраженность патологий внутренних органов и липоидных скоплений радужной форели *Parasalmo (=Oncorhynchus) mykiss* после введения антибиотиков в растворе Рингера после 3 инъекций (а), после 5 инъекций (б):
 1 – липоидные скопления
 2 – селезенка
 3 – желчный пузырь
 4 – пилорические придатки
 5 – печень
 6 – почки
 7 – жабры
 8 – кишечник

После 5 инъекции раствора Рингера для холоднокровных уменьшалась фракция альбуминов и преальбуминов на электрофореграммах сыворотки крови. В группе бензилпеницилина после 3 инъекций практически отсутствовала фракция альбуминов после 3 инъекций, после 5 инъекций увеличивалось число фракций в области альбуминов и преальбуминов. В

группе окситетрациклина после 3 инъекций отсутствовали фракции альбуминов после 3 инъекций, и после 5 инъекций появилась фракция в области альбуминов (Рис. 19, 20).

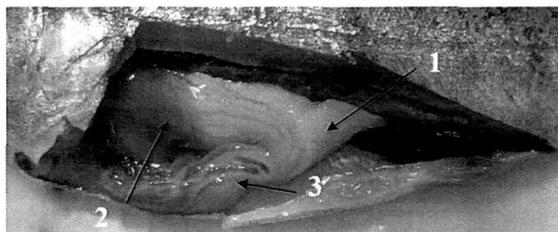
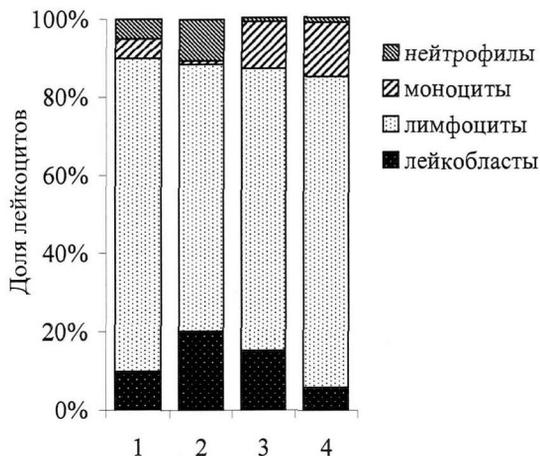


Рис. 17. Патологии внутренних органов радужной форели после 5 инъекций антибиотиков. 1 – липоидные скопления; 2 – гиперемия печени; 3 – гиперемия и дряблость пилорических придатков

Рис. 18. Относительное число различных форм лейкоцитов (в %) в крови радужной форели. 1 – интактные; 2 – инъекции раствора Рингера; 3 – инъекции бензилпенициллина; 4 – инъекции окситетрациклина.



Введение антибиотиков даже при минимальном количестве введений, при минимальной дозе, увеличивает количество липоидных скоплений, начинается процесс патологий внутренних органов, изменение клеточного и белкового состава крови.

У первоначально здоровых особей начинают развиваться клинические проявления заболевания, ухудшение иммунного статуса рыб, все это приводит к развитию условно патогенной микрофлоры и восприимчивости к другим инфекциям.

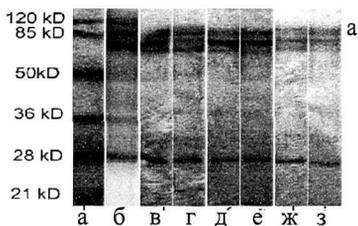
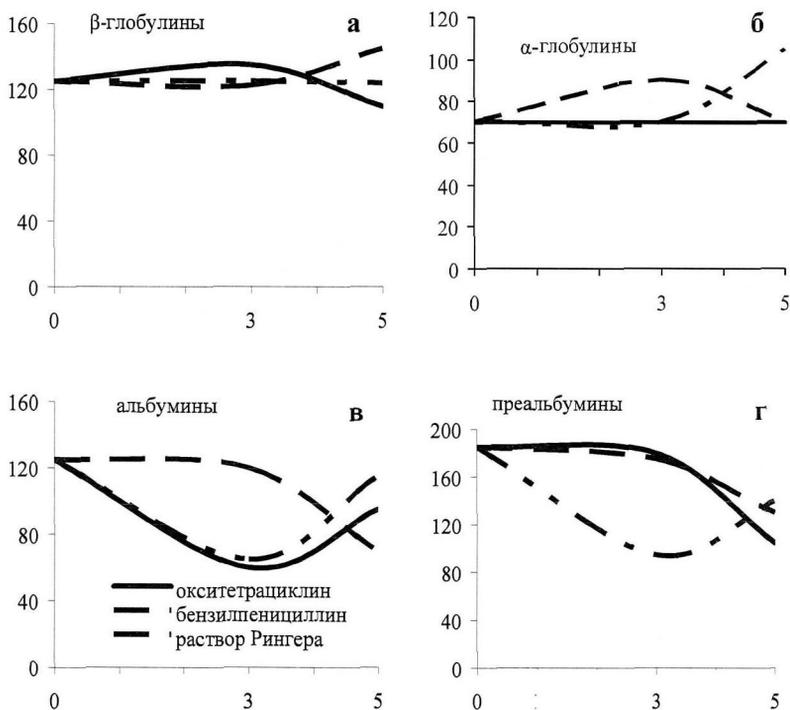


Рис. 19. Электрофореграммы сыворотки крови радужной форели. а – стандартный маркер б – интактные в – 3 инъекции раствора Рингера г – 5 инъекций раствора Рингера д – 3 инъекции бензилпенициллина е – 5 инъекций бензилпенициллина ж – 3 инъекции окситетрациклина з – 5 инъекций окситетрациклина

Рис. 20 а-г. Усредненный график изменения основных фракций белков сыворотки крови рыб. По оси ординат средняя интенсивность фракции. По оси абсцисс 3 и 5 введений, 0 – контроль.



3.4. Оценка вкусовой привлекательности антибиотиков для радужной форели.

Пероральный способ введения в организм рыб лечебных препаратов является наиболее простым и распространенным. Однако включение дополнительных ингредиентов в рецептуру кормов может влиять на органолептические свойства, снижать их хемосенсорную привлекательность для рыб. Вкусовая рецепция у рыб хорошо развита, ее роль в формировании у рыб решения о заглатывании или отвергании пищи является решающей (Kasumyan, Døving, 2003). В связи с этим нами были выполнены эксперименты, основной целью которых была оценка вкусовой привлекательности для рыб нескольких антибиотиков. В наши задачи входило также выяснение особенностей пищевого поведения рыб, проявляемого при тестировании ими искусственных пищевых гранул, содержащих антибиотики. Эксперименты выполнены на радужной форели.

Таблица 2. Вкусовая привлекательность антибиотиков для радужной форели. М ± m – среднее значение показателя и его ошибка; отличия относительно интактных особей достоверны при p: * – < 0.05, ** – < 0.01, *** – < 0.001.

Раздражитель	Концентрация, мг/мл	Потребление гранул, %	Индекс вкусовой привлекательности, %
Бензилпенициллин	1	45.0 ± 5.0	0-0.09
	10	53.0 ± 5.0	0-0.01
	100	24.0 ± 4.3***	-38.46
Окситетрациклин	1	32.0 ± 4.7**	-25.58
	10	73.0 ± 4.5**	-14.96
	100	74.0 ± 4.4**	-15.63
Цефазолин-акос	1	30.0 ± 4.6***	-28.57
	10	46.0 ± 5.0	0-0.08
	100	34.0 ± 4.8**	-22.73
Неомицин	1	90.0 ± 3.0***	-25.00
	10	98.0 ± 1.4***	-28.95
	100	98.0 ± 1.4***	-28.95
Экстракт личинок хирономид	175	98.0 ± 1.4***	-28.95
Контроль		54.0 ± 5.0	-

Испытанные антибиотики значительно различаются между собой по вкусовой привлекательности для радужной форели. Наиболее сильным привлекательным вкусом обладает сульфат неомицина (Табл. 2), гранулы с которым подопытные рыбы потребляли почти во всех опытах (от 90% до 98%, в зависимости от концентрации). По своей эффективности сульфат неомицина сравним с высокопривлекательным для рыб экстрактом мотыля (98%). Натриевая соль бензилпенициллина при относительно низкой концентрации (1-

10 мг/мл) характеризуется инертным вкусом и значимо не влияет на потребление рыбами гранул. Однако при высоком содержании в гранулах (100 мг/мл) этот антибиотик приобретает свойства детеррента, подавляющего потребление гранул более чем в 2 раза по сравнению с контролем. Цефазолин-акос при высокой и низкой концентрации (1 и 100 мг/мл) вызывает у рыб негативные вкусовые ответы, однако при промежуточной концентрации (10 мг/мл) этот эффект не проявляется. У гидрохлорида окситетрациклина наблюдается положительная связь между вкусовой привлекательностью и концентрацией антибиотика: с повышением его содержания в гранулах их потребление рыбами закономерно растет, причем наиболее быстро в диапазоне концентраций от 1 до 10 мг/мл, когда статистически достоверное детеррентное действие ($p < 0.01$) сменяется достоверным стимулирующим эффектом ($p < 0.01$) (табл. 2).

Гранулы с наиболее высоким уровнем потребления (сульфат неомицина 1-100 мг/мл, гидрохлорид окситетрациклина 10-100 мг/мл, экстракт личинок хинономид 175 мг/мл) значительно реже, чем контрольные, подвергаются повторным тестированиям (отверганиям и повторным схватываниям), а также намного дольше удерживаются подопытными рыбами в ротовой полости как при первом схватывании, так и в течение опыта. Все остальные гранулы (гидрохлорид окситетрациклина 1 мг/мл, цефазолин-акос и натриевая соль бензилпенициллина 1-100 мг/мл) рыбы в среднем схватывали повторно столько же раз, что и контрольные гранулы. Однако средняя длительность удержания почти всех типов этих гранул короче, чем контрольных, в ряде случаев это различие статистически достоверно (табл. 3).

Сравнение реакции рыб на гранулы в опытах, завершившихся потреблением гранулы, и в опытах, в которых гранула рыбами отвергалась, показывает, что эти группы опытов различаются между собой по длительности тестирования рыбами свойств гранул. В опытах, завершившихся потреблением гранулы, гранулы удерживаются в 3-4 раза дольше как при первом схватывании, так и в течение всего опыта, по сравнению с опытами, закончившимися отверганием гранулы. Причем в этих возможных вариантах завершения опыта (отвергание или потребление гранулы) длительности удержаний гранул в ротовой полости близкие для разных типов гранул. Так, в опытах с потреблением длительность удержания варьирует от 6.4 до 8.4 с при первом схватывании и от 6.8 до 9.0 с за все время опыта, в опытах с отверганием – от 1.3 до 2.3 и от 2.0 до 2.7 с, соответственно (без учета выборок с минимальным числом опытов – 2). В опытах с отверганием рыбы в среднем совершали большее число повторных схватываний (10 типов гранул из 14), причем для большинства типов гранул эти различия были статистически достоверными (табл. 3).

Таблица 3. Параметры вкусового ответа ($M \pm m$) радужной форели в опытах, закончившихся потреблением (над чертой) или отверганием (под

чертой) гранул с антибиотиками. $M \pm m$ – среднее значение показателя и его ошибка; отличия относительно интактных особей достоверны при $p: * - < 0.05$.

Раздражитель	Концентрация, мг/мл	Число схватываний	Продолжительность удержания гранулы, с	
			после первого схватывания	в течение всего опыта
Бензилпенициллин	1	$\frac{1.3 \pm 0.1}{1.7 \pm 0.1^*}$	$\frac{7.4 \pm 0.4}{1.5 \pm 0.1^{***}}$	$\frac{8.2 \pm 0.3}{2.2 \pm 0.2^{***}}$
	10	$\frac{1.4 \pm 0.1}{1.7 \pm 0.2^*}$	$\frac{7.1 \pm 0.4}{1.5 \pm 0.1^{***}}$	$\frac{8.5 \pm 0.3}{2.5 \pm 0.3^{***}}$
	100	$\frac{1.8 \pm 0.3}{1.6 \pm 0.1}$	$\frac{6.6 \pm 0.7}{1.7 \pm 0.1^{***}}$	$\frac{8.3 \pm 0.5}{2.3 \pm 0.2^{***}}$
Окситетрациклин	1	$\frac{1.3 \pm 0.1}{1.9 \pm 0.2^{**}}$	$\frac{7.0 \pm 0.5}{1.3 \pm 0.1^{***}}$	$\frac{7.9 \pm 0.4}{2.2 \pm 0.2^{***}}$
	10	$\frac{1.1 \pm 0.0}{1.4 \pm 0.1^{***}}$	$\frac{8.4 \pm 0.3}{1.6 \pm 0.2^{***}}$	$\frac{8.7 \pm 0.3}{2.0 \pm 0.2^{***}}$
	100	$\frac{1.0 \pm 0.0}{1.5 \pm 0.1^{***}}$	$\frac{8.4 \pm 0.3}{1.6 \pm 0.2^{***}}$	$\frac{8.6 \pm 0.3}{2.0 \pm 0.3^{***}}$
Цефазолин-акос	1	$\frac{1.6 \pm 0.2}{1.5 \pm 0.1}$	$\frac{6.8 \pm 0.6}{1.6 \pm 0.1^{***}}$	$\frac{8.7 \pm 0.4}{2.1 \pm 0.2^{***}}$
	10	$\frac{1.6 \pm 0.2}{1.9 \pm 0.2}$	$\frac{6.9 \pm 0.4}{1.6 \pm 0.1^{***}}$	$\frac{8.2 \pm 0.3}{2.6 \pm 0.3^{***}}$
	100	$\frac{1.6 \pm 0.2}{1.6 \pm 0.1}$	$\frac{6.9 \pm 0.7}{1.9 \pm 0.2^{***}}$	$\frac{9.0 \pm 0.4}{2.5 \pm 0.2^{***}}$
Сульфат неомицина	1	$\frac{1.0 \pm 0.0}{1.3 \pm 0.2^{**}}$	$\frac{7.7 \pm 0.3}{2.3 \pm 0.9^{***}}$	$\frac{7.9 \pm 0.2}{2.6 \pm 0.8^{***}}$
	10	$\frac{1.0 \pm 0.0}{1.5 \pm 0.5^{***}}$	$\frac{8.2 \pm 0.3}{1.8 \pm 0.2^{***}}$	$\frac{8.4 \pm 0.2}{2.4 \pm 0.4^{***}}$
	100	$\frac{1.1 \pm 0.0}{1.0 \pm 0.0}$	$\frac{7.5 \pm 0.3}{2.6 \pm 1.0^*}$	$\frac{7.8 \pm 0.2}{2.6 \pm 0.1^{**}}$
Экстракт хирономид	175	$\frac{1.1 \pm 0.0}{4.0 \pm 1.0^{***}}$	$\frac{6.4 \pm 0.3}{1.2 \pm 0.0^*}$	$\frac{6.8 \pm 0.3}{4.0 \pm 1.0}$
Контроль		$\frac{1.6 \pm 0.2}{1.9 \pm 0.2}$	$\frac{6.5 \pm 0.4}{1.9 \pm 0.2^{***}}$	$\frac{8.3 \pm 0.3}{2.7 \pm 0.3^{***}}$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с поставленной целью и задачами были проведены исследования трески и наваги из природных популяций Белого моря, карпа и радужной форели, содержащихся в искусственных условиях. Использование количественного показателя (лейкоцитарная формула крови) и качественных (белковый профиль сыворотки крови, патоморфологический анализ) позволило оценить иммуно-физиологический статус рыб, находящихся в разных условиях.

Установлено, что в природных водоемах при низком уровне антропогенной нагрузки и загрязнений рыбы демонстрируют сложившуюся эволюционно норму реакции. На примере трески и наваги Белого моря определено влияние паразитарной и бактериальной инфекции на иммунологические параметры рыб. Патологии органов, наблюдаемые у большинства особей, коррелируют со степенью инвазии и составом микрофлоры кишечника исследованных рыб. На основании анализа состояния внутренних органов, лейкоцитарной формулы и фракционного состава сыворотки крови сделан вывод, что в данных климатических условиях зараженность внутренних органов рыб гельминтами менее 10 экземпляров на особь может быть принята за норму. При таком значении интенсивности инвазии гематологические показатели пораженных особей и особей, не имеющих паразитов, близки. При усилении зараженности и при доминировании условно-патогенных бактерий в кишечнике проявляются патологические изменения внутренних органов, а изменения иммунологических параметров свидетельствуют об угнетении лимфопоэза, и ослаблении иммуно-физиологического состояния рыб.

В аквакультуре рыбы более всего подвержены бактериальным и вирусным инфекциям. На примере карпа было исследовано влияние бактериальной (аэромоназ), вирусной (весенняя виремия карпа) и смешанной инфекций на иммунологические показатели. Определены явные различия белкового профиля сыворотки крови и лейкограммы у рыб, зараженных различными типами инфекций. Эти критерии могут использоваться как диагностический тест.

Для предотвращения вспышек заболеваний при искусственном разведении рыб и других гидробионтов применяют лекарственные препараты. Антибиотики, как многие другие экзогенные вещества, обладают собственным действием на организм рыб, нередко приводящим к реинфекциям или вторичным инфекциям. При исследовании наиболее распространенных в ветеринарии препаратов – натриевой соли бензилпенициллина и гидрохлорида окситетрациклина обнаружено негативное действие этих препаратов на иммунологические и физиологические параметры здоровых особей радужной форели. Длительное применение антибиотиков приводит к усилению и распространению патологий внутренних органов. Введение бензилпенициллина и окситетрациклина вызывает подавление гемопоэза, что проявляется в виде нейтропении, резкого снижения бластных форм клеток крови, уменьшения

фракции альбуминов. Суммарным эффектом является снижение иммунитета особей и усиление зараженности условно-патогенными бактериями и вирусами.

Несмотря на негативные аспекты использования антибиотиков, их применение необходимо для контроля массовых заболеваний в аквакультуре. Наиболее удобным способом лечения является добавление лекарственных препаратов в корм. При исследовании четырех различных антибиотиков было обнаружено, что они могут иметь диаметрально противоположные вкусовые свойства для рыб. Например, неомицин и окситетрациклин (в концентрации 100 мг/мл) обладают высокопривлекательными свойствами для радужной форели, а цефазолин-акос и бензипенициллин (в концентрации 100 мг/мл) проявляют свойства детеррента.

Известно, что вкусовые спектры у рыб характеризуются высокой межвидовой вариабельностью. Вещества, привлекательные или отталкивающие по вкусу для одних видов могут быть индифферентными вкусовыми стимулами или иметь противоположные вкусовые свойства для рыб других видов. Эта особенность вкусовой рецепции важна при выборе антибиотиков и других терапевтических препаратов для практического использования в аквакультуре, поскольку вкусовые свойства одного и того же лекарственного средства для разных видов рыб могут резко различаться. Препараты с неблагоприятным вкусом будут снижать пищевую активность рыб и, как следствие, приводить к развитию нежелательного побочного эффекта – к снижению темпа роста, к ухудшению или медленному восстановлению состояния рыб после лечения, к неэффективным тратам корма.

Использование разных типов гранул, отличающихся по составу или концентрации присутствующих в них веществ, позволило подтвердить ряд важных общих закономерностей тестирования рыбами пищевых объектов. Поведение тестирования пищи, как показывают наши результаты, у радужной форели может развиваться по одному из двух стереотипов. Стереотип, заканчивающийся потреблением объекта, характеризуется длительным внутриротовым опробыванием объекта, в 3-4 раза более продолжительным, чем стереотип, заканчивающийся отверганием объекта. По числу отверганий и повторных схватываний объекта эти стереотипы у радужной форели отличаются слабо, хотя можно отметить, что в случае потребления число манипуляций с гранулами обычно меньше. Наличие у рыб двух стереотипов тестирования пищевых объектов выявлено к настоящему времени лишь на примере ограниченного числа видов рыб.

Контроль вкусовой компоненты лечебных кормов и диагностика состояния рыб по клеточному и белковому составу крови позволит определить оптимальную схему применения лекарственных препаратов, учитывающую видовые особенности выращиваемых рыб, что, в свою очередь, приведет к минимизации экономических затрат на профилактику здоровья рыб и устранение вспышек заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. В природных популяциях трески *Gadus morhua maris-albi* и наваги *Eleginus navaga* Белого моря большинство особей поражены паразитарными инвазиями. Преобладающими гельминтами во внутренних органах у трески и наваги являются скребни *Echinorhynchus gadi*, нематоды *Anisakis simplex*, *Hysterothylacium aduncum gadi*, трематоды *Pyramicocephalus phocarum*, цестоды *Bothricephalus acheilognathi*. При интенсивности инвазии менее 10 гельминтов на особь белковый профиль сыворотки крови и лейкограмма у трески и наваги не изменяются.
2. При интенсивности инвазии, превышающей 10 экземпляров гельминтов на особь, и при доминировании в кишечнике бактерий рода *Pseudomonas* у тресковых рыб наблюдается фибринозное воспаление внутренних органов, в белковом профиле сыворотки крови повышается уровень преальбуминов и глобулинов, снижается уровень альбуминов, в крови изменяется процентное соотношение лейкоцитов. Это указывает на изменение реакций врожденного иммунитета и, в целом, на снижение иммунофизиологического статуса рыб. Усиление инвазии (20 и более многоклеточных паразитов на особь) приводит к дальнейшему подавлению у рыб иммунных функций.
3. Поражение вирусной, бактериальной и смешанной инфекциями вызывает у искусственно выращенных рыб (каrp *Suyprius carpio*) специфические изменения в белковом составе сыворотки крови. При вирусной инфекции в составе сыворотки крови увеличивается фракция глобулинов, снижается содержание альбуминов и преальбуминов; при бактериальной инфекции возрастает содержание фракции альбуминов и преальбуминов, смешанная инфекция сопровождается снижением в сыворотке крови фракции γ -глобулинов и повышением фракции альбуминов.
4. Применение антибиотиков (натриевая соль бензилпенициллина, гидрохлорид окситетрациклина) вызывает у здоровых рыб (молодь радужной форели *Parasalmo (=Oncorhynchus) mykiss*) нейтропению, приводит к исчезновению альбуминовой фракции в сыворотке крови, индуцирует появление липоидных скоплений и других патологий внутренних органов, что свидетельствует о снижении общей резистентности рыб к инфекциям.
5. Присутствие антибиотиков в составе искусственных кормов может существенно изменить их вкусовую привлекательность для выращиваемых рыб. Антибиотики цефазолин-акос и натриевая соль бензилпенициллина в высоких концентрациях и гидрохлорид окситетрациклина в низких концентрациях обладают отталкивающим (детеррентным) вкусом для радужной форели. Антибиотики сульфат неомицина в широком диапазоне концентраций и окситетрациклин в высоких концентрациях имеют привлекательный вкус для радужной форели и повышают потребление искусственных пищевых гранул.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Завьялова Е.А., **Маклакова М.Е.**, Пичугина Т.Д., Борисова М.Н., Кондратьева И.А. 2006. Особенности морфологии культур клеток из различных органов рыб и влияние на них некоторых вирусов. Материалы Международной научной конференции «Физиология микроорганизмов в природных и экспериментальных системах» Москва, МГУ имени М.В.Ломоносова, 16-19 мая, М.: МАКС Пресс - с. 12-14.
2. **Маклакова М.Е.**, Кондратьева И.А., Пичугина Т.Д., Борисова М.Н. 2008. Диагностика заболеваний по белковому профилю сыворотки крови рыб. Российский иммунологический журнал. Т.2 (11), 2-3, с. 168.
3. **Маклакова М.Е.**, Ступин Р.В., Кондратьева И.А. 2009. Исследование влияния различных агентов на иммуно-физиологический статус радужной форели. Бюллетень МОИП. Т. 114, № 2, с. 64-65.
4. Kondratieva I.A., **Maklakova M.E.**, Riabov V.B., Gui L.X. 2009. Principle directions of aquaculture research in Russia and China. Proceeding of the Third Bilateral Conference between Russia and United States on Aquatic Animal Health. Shepherdstown, WV, USA. P. 25
5. Кондратьева И.А., **Маклакова М.Е.**, Гуй Ляньсин. 2010. Аквакультура КНР и России: научные центры по изучению патологии рыб и других объектов. Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. №3, с. 34-40.
6. **Maklakova M. E.**, Kondratieva I. A., Mikhailova E. S., Stupin R. V., Kharpchaev Sh. Yu., and Kasumyan A. O. 2011. Effect of Antibiotics on Immunophysiological Status and Their Taste Attractiveness for Rainbow Trout *Parasalmo (=Oncorhynchus) mykiss* (Salmoniformes, Salmonidae). Journal of Ichthyology. V. 51, № 11, P. 1131-1142.
7. Kondratieva I.A., **Maklakova M.E.**, Riabov V.B., Gui L.X. 2011. Principle directions of aquaculture research in Russia and China. in Cipriano R.C., Bruckner A.W., Schelkunov I.S., editors. Bridging America and Russia with shared perspectives on aquatic animal health. Proceeding of the Third Bilateral Conference between Russia and United States. Shepherdstown, WV. P. 357.
8. **Маклакова М.Е.**, Хапчаев Ш.Ю., Р.В. Ступин, И.А. Кондратьева. 2012. Воздействие температурного стресса на иммунореактивность рыб. Рыбное хозяйство. № 1, с. 53-54.

Отпечатано в копицентре «СТ ПРИНТ»
Москва, Ленинские горы, МГУ, 1 Гуманитарный корпус.
e-mail: globus9393338@yandex.ru тел.: 939-33-38
Тираж 100 экз. Объем 1.0 п.л.
Подписано в печать 21.02.2012 г.