АСТРАХАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

УДК

КАСАЕВА СВЕТЛАНА ЮРЬЕВНА

ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

Специальность 03.00.13- физиология

АВТОРЕФЕРАТ
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Астрахань - 2007

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

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор Д.Л. Теплый
Научный консультант:
кандидат биологических наук Н.В. Судакова

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук, Нестеров
доктор биологических наук, профессор В.М. Распопов

Ведущая организация:

Защита состоится……. на заседании регионального диссертационного совета ДМ 212.009.01 в Астраханском государственном Университете по адресу:

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

Цель и задачи. Целью исследований являлось изучение влияния рекомбинантного интерлейкина-2 (rIL-2- Ронколейкин) на физиолого-иммунологические и биологические показатели осетровых рыб при реабилитации после лапаротомии и подрезания яйцеводов при получении половых продуктов, повышающего иммунореактивность и резистентность рыб к экстремальным условиям рыбоводного процесса, таким как неблагоприятный температурный режим и хендлинг.

Основные задачи работы:

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

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

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

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

Предмет защиты Научное обоснование целесообразности применения рекомбинантного интерлейкина-2 в осетроводстве.

Апробация работы. В диссертации подведены итоги исследований, выполненных автором в 2005-2007 гг. Материалы работы обсуждались на IV Международной научно-практической конференции «Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы» (Астрахань, 13-15 марта 2006г), Международном симпозиуме «Тепловодная аквакультура и биологическая продуктивность водоемов аридного климата» (Астрахань, 16-18 апреля 2007г), Международной конференции «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов-2» (п. Борок, ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН, 17-20 июля 2007 г). По материалам диссертации опубликовано 11 работ, имеется заявка на выдачу патента на изобретение.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературных данных, описания материала и методов исследования, собственных данных, заключения, выводов, рекомендаций и списка литературных источников, включающего 305 наименований, в том числе 64 зарубежных авторов. Текстовая часть изложена на 139 страницах машинописного текста, иллюстрированного 26 таблицами и 15 рисунками.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Приводятся данные о современных представлениях организации иммунной системы рыб, в том числе о гуморальных и клеточных факторах, строении и функционировании гемопоэтических органов. Описаны структурное и функциональное разнообразие активных молекул, обладающих свойствами антител и регуляторов клеточной активности (цитокинов); принадлежность антител к различным белковым фракциям и широкий диапазон их молекулярной массы; секреторных антител и изотипов антител. Также представлены сведения о физиолого-иммунологическом состоянии осетровых рыб в современных условиях, как в естественной среде их обитания, так и при искусственном выращивании.

Проведен анализ современных методов лечения и профилактики различных заболеваний осетровых рыб в условиях аквакультуры. Рассмотрены аспекты цитокинотерапии с использованием rIL-2 в ветеринарии и медицине.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

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

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

2.3.Экспериментальная работа с молодью гибрида русско-сибирского осетра ранних сроков получения (Acipenser guldenshtadti, B. x Acipenser baeri, B.) была проведена в июле 2005 г при неблагоприятном температурном режиме воды (свыше 26,0 ^{0}C). Первая группа рыб в количестве 70 экз. была об-

работана Ронколейкином в дозе 200 тыс. ед./100л воды, вторая (64 экз.) - 300 тыс.ед./100 л, третья (84) - 400 тыс.ед. /100 л, четвертая (98 экз.) - контроль. В среднем биомасса рыб составила 6,25 кг на бассейн. Экспозиция препарата составляла 30 мин.

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

2.5.Методы гематологических и физиолого-иммунологических исследований

При осмотре бестера оценивали состояние операционного шва, меток, кожных покровов, у производителей стерляди - состояние генитального отверстия. Отбор проб крови у рыб во всех экспериментах выполняли прижизненно пункцией хвостовой вены.

Мазки крови фиксировали раствором Майн-Грюнвальда, докрашивали азур-эозином по Романовскому. Подсчет лейкоцитарной формулы проводили по методике Ивановой (1983), форменных элементов крови - в счетной камере Горяева, СОЭ - по методу Панченкова (Лиманский и др., 1984). Гемоглобин в крови определяли гемоглобинцианидным методом (метод Drabkin). Общий белок в сыворотке крови исследовали биуретовым методом (Меншиков, 1973), альбумин по реакции с бромкрезоловым зеленым (Лукичева, Синтебова, 1974), а иммуноглобулины по методике Воловенко М.А. (1975). Лизосомально-катионный тест (ЛКТ) проводили по методу Пигаревского В.Е., Мазинга Ю.А. (1981).

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

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

Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами статистического анализа (Лакин, 1980) с использованием пакета программы Microsoft Exel. Достоверность отличий сравниваемых признаков оценивали с помощью st-критерия Стьюдента при допустимой вероятности ошибки $p<0,05$, $p<0,001$.

Объем собранного и проанализированного материала представлен в таблице 1.

Таблица 1 - Объем собранного и проанализированного материала

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

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

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

Таблица - 2 Клиническая картина операционных швов у бестеров

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

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

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

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

Таблица 3- Гематологические показатели бестеров

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

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

Компенсация гемоглобина после операционной кровопотери происходила различными путями: у групп 1 и 3 на фоне снижения общего числа эритроцитов увеличивался Hb в одном эритроците, а у группы рыб, инъецированной rIL-2 в дозе 2000 ед./кг - за счет увеличения эритроцитов в крови на 43,2 и 23,4% относительно опыта- 1 и контроля. На 30-е сутки у этой группы рыб отмечено увеличение концентрации гемоглобина при снижении количества эритроцитов крови.

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

СОЭ у рыб с инъекцией антибиотика зарегистрированы на тридцатые сутки при $p<0,05$.

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

Данные таблицы 4 свидетельствуют о перераспределении относительного количества клеток в лейкограмме в сторону нейтрофилии ($p<0,05$) со сдвигом влево у всех групп оперированных особей. Также у групп 1 и 2 увеличилось содержание моноцитов в 2,1 и 1,7 раза. Относительное число эозинофилов, напротив, уменьшилось в 2 и 1,1 раза, а в абсолютных значениях увеличилось в среднем в 3,5 раза. У рыб инъецированных окситетрациклином абсолютное количество эозинофилов превысило типичные показатели в 6,0 раз ($p<0,05$), что, по всей видимости, обусловлено интоксикацией организма, вызванной окситетрациклином.

Таблица 4 - Лейкоцитарная формула бестеров (%)

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

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

На 30-45 сутки у рыб отмечали четкий лимфоцитарный профиль, но у рыб 3-ей группы зарегистрирована стабильная эозинофилия. Число эозино-

фильных гранулоцитов в группе рыб с антибиотиком превышало 2,2 раза при ($p<0,05$) по сравнению с рыбами, которым был введен rIL-2. При сопоставлении данных лейкограмм и лимфоцитарного профиля с клинической картиной в операционной области, выявлено, они характеризуют неодинаковую клиническую картину - острое воспаление у рыб, инъецированных rIL-2 с последующей ускоренной регенерацией тканей, и вялотекущую воспалительную реакцию у бестеров с инъекцией окситетрациклина.

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

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

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

В результате ихтиопатологического обследования прооперированных самок обнаружено, что послеоперационное восстановление у самок из группы с двукратной дозой 5 тыс.ед/кг массы тела происходило в среднем на 7 суток быстрее, чем с дозой 3 тыс.ед/ кг и у контрольных рыб (таблица 9). Кроме того, в этих группах зарегистрирована гибель.

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

Вариант	Состояние рыбы в баллах	Всего рыб экз.	Сутки			
			0	7	14	21
rIL-2 3 тыс.ед./кг х 2 (Опыт 1)	-	10	-	-	1	5
	+		-	2	4	4
	++		6	3	4	-
	+++		4	5	1	-
	++++				1	
rIL-2 5 тыс.ед./кг х 2 (Опыт2)	-	11	-		4	9
	+		-	3	6	2
	++		8	4	1	-
	+++		3	3		-
	++++					
Контроль	-	10	-	-	1	4
	+		-	1	2	4
	++		7	4	4	-
	+++		3	2	1	-
	++++			1	1	

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

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

При сравнении данных по $К_{(ф)}$, обнаружено, что у всех экспериментальных рыб на нулевые сутки этот показатель снизился, причем у группы (опыт 1) на 10,4%, (опыт 2) на 14,6%, а у контрольных рыб на 19,86%, относительно аналогичных показателей до получения половых продуктов. При этом, достоверные изменения ($p<0,001$) выявлены только у второй опытной группы и контроля. Проведенный анализ показал, что в период 0-21 сутки коэффициент упитанности у стерляди повысился на 2,0; 4,8% соответственно по группам – 1, 2, а у контрольной группы рыб оставался без изменений. Явные изменения зафиксированы только у второй опытной группы ($p<0,05$).

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

Таблица 6 - Гематологические показатели самок стерляди

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

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

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

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

Выявлено, что после операции концентрация общего белка в сыворотке крови уменьшалась в течение 14 суток на 21,1; 24,2; 18,2%, соответственно по группам (опыт 1), (опыт 2), (контроль), в основном, за счет альбуминовой фракции. Доля иммуноглобулинов при этом находилась на одном уровне ($p>0,05$) и возрастала только у группы рыб (опыт 2) при $p<0,05$. Также у рыб из всех групп, отмечено перераспределение процентного соотношения иммуноглобулинов к общему белку на 16,8; 37,2; 18,4 %, соответственно по груп-

пам (опыт 1), (опыт 2), контроль. Однако, только у второй опытной группы повышение процентного соотношения иммуноглобулинов было достоверным ($p<0,05$). Кроме того, в этот период выявлены различия ($p<0,05$) между второй опытной группой и контрольной на 7-е и между второй группой и первой опытными группами на 14-е сутки. Это свидетельствует об усилении иммунореактивности у особей опытной группы с дозой rIL-2- 5 тыс. ед/кг.

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

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

Таблица 7 - Лейкоцитарная формула производителей стерляди в условиях эксперимента (%)

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

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

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

лютное количество возросло на 8,5; 29,9; 30,9%, соответственно по группам. Абсолютное количество моноцитов в крови несколько снизилось в среднем с 1,5 до 1,1 тыс.шт./мкл.

На седьмой день исследований в лейкоцитарной формуле у рыб из группы, проинъецированных rIL-2 в дозе 5 тыс.ед./кг обнаружено увеличение количества лимфоцитов при $p<0,05$, у особей из первой опытной и контрольной, продолжалось снижение количества лимфоцитов и увеличение числа палочкоядерных, сегментоядерных нейтрофилов. При этом абсолютное число лимфоцитов в крови продолжало повышаться, достигая значений - 109,0; 149,8; 89,2 тыс.шт./мкл, соответственно по группам рыб: опыт 1, опыт 2, контроль. Абсолютное число моноцитов также имело тенденцию к повышению. Однако данный показатель у рыб из контрольной группы был на 59,3 и 41,7% выше, чем у производителей стерляди из групп (опыт 1) и (опыт 2), что может свидетельствовать о развитии бактериемии или увеличением продуктов распада в крови

К четырнадцатым суткам лейкоцитарная формула сохранялась, при этом отмечено снижение абсолютного числа лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов, палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов практически до первоначальных показателей. Однако, у рыб из группы контроля зарегистрировано превышение числа эозинофилов в среднем на 43,2%, относительно опытных групп.

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

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

3.3 Влияние rIL-2 на физиологические и биологические показатели молоди гибрида русско-сибирского осетра в условиях неблагоприятного температурного режима

В условиях Юга России на осетровых хозяйствах рыбоводы часто сталкиваются с проблемами, связанными с ухудшением условий выращивания рыб, особенно при высоких температурах воды. Поэтому данная работа была приурочена температурам воды свыше оптимальных для выращивания осетровых рыб +25 ^{0}С.

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

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

Таблица 8Гематологические показатели крови молоди РО х СО

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

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

Зарегистрировано увеличение данного показателя у рыб из опытных вариантов на 75,0; 200,0; 60,0%, соответственно по группам, опыт-1, опыт-2, опыт-3. Это свидетельствует о напряженности клеточного иммунитета и связано с усилением иммунореактивности благодаря rIL-2. В контроле число лейкоцитов снизилось на 20,0%, это, вероятно, обусловлено угнетением лейкопоэза и негативным воздействием на организм рыб высоких температур водной среды в этот период.

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

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

Таблица 9 - Лейкоцитарная формула молоди РО х СО (%)

Вариант	Сутки	Лимфоциты	Моноциты	Эозинофилы	Сегменто-ядерные нейтрофилы	Палочко-ядерные нейтрофилы
контроль	0	61,00±4,54	2,09±0,39	20,75±2,92*	4,45±0,77	14,09±2,26
Опыт 1		68,95±1,91*	2,11±0,43	9,55±0,99*	5,86±0,83	13,53±0,80
Опыт2		57,15±5,27*	2,43±0,39	17,50±3,24*	4,49±0,80	11,16±2,35
Опыт 3		69,66±4,31	2,14±0,32	14,33±2,85	5,33±0,61	12,40±1,84
контроль	15	60,68±1,19	2,24±0,18	14,12±1,92	7,93±1,05	15,03±1,55
Опыт 1		63,75±4,97	2,50±0,49*	10,20±2,20*	6,50±1,80	17,05±3,11
Опыт 2		75,73±1,45	1,35±0,47	6,19±0,79	4,50±1,16	12,23±1,50
Опыт 3		67,79±3,10	2,33±0,53	8,63±1,36	6,83±0,93	14,42±2,21
контроль	30	65,75±1,38	1,95±0,31	12,85±2,04	9,40±1,20	11,25±1,46
Опыт 1		70,75±2,53	2,30±0,51	7,95±1,49	6,50±1,71	12,50±1,33
Опыт2		75,65±1,49	1,50±0,46	4,95±0,78*	4,95±1,16	13,35±1,40
Опыт 3		69,96±2,82	2,08±0,35	7,08±1,14	7,33±0,94	13,54±2,21

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

В контроле число эозинофилов снизилось на 31,95%, а в опыте-1 уменьшилось количество лимфоцитов на 7,54 %, доля палочкоядерных нейтрофильных гранулоцитов возросла, но изменения последних были в пределах ошибки. В абсолютных значениях была отмечена иная картина. Так, у рыб из группы контроля зафиксировано снижение количества лимфоцитов и эозинофилов на 20,3 и 46,1 %, соответственно, а у молоди из первого опытного ва-

рианта, напротив число лимфоцитов и эозинофилов повысилось на 61,5 и 21,0%, соответственно, по формам клеток. При этом у групп рыб, которых обрабатывали иммунокорректором в дозах 300 и 400 тыс. ед./100 л отмечена та же тенденция, при которой численность лимфоцитов в крови молоди РО х СО также возросла, причем довольно значительно - в 3,9 и 1,6 раза, относительно первоначальных показателей. Это очевидно, обусловлено стимуляцией rIL-2 лимфопоэза. Статистический анализ позволил выявить различия ($p<0,001$) по числу лимфоцитов между контролем и всеми опытными группами рыб, и между вариантами с дозами 200 тыс. ед.- и 300 тыс. ед./100 л ($p<0,05$). Кроме того, достоверные различия были между группами особей с дозами 300 тыс. ед. - и 400 тыс.ед./100 л и контролем по количеству моноцитов при $p<0,05$ и эозинофилов при $p<0,001$.

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

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

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

В результате изучения динамики размерно-весовых показателей обнаружено отставание рыб группы контроля по средней массе и длине на 6,22 % и 8,73 % соответственно по показателям от особей группы 3. При этом различия между контролем и опытом 3 были достоверны при $p<0,05$. Также отличалась на 9,88% от третьей опытной группы рыб по средней массе молодь из первой опытной с дозой Ронколейкина – 2 тыс.ед./кг массы тела с трехкратной дачей препарата в корм. При детальном изучении данных процессов обнаружено, что в период с 14 по 21 сутки отмечено снижение темпа роста у особей из всех групп. Периоды усиления и снижения относительного прироста у рыб связаны с тем, что накопление массы чередуется с ростом в длину. При чем характер изменений может свидетельствовать о состоянии организма рыб. Так, контрольные рыбы имели самые низкие показатели с 14 по 28 сутки эксперимента. В этот же период у этой молоди отмечено покраснение брюшных жучек. Это, вероятно, связано с тем, что эта молодь была больше подвержена стрессу в отличие от молоди из опытных вариантов. Кроме того, в период с 14 по 21 сутки отмечено, что молодь белуги из опыта -1 в среднем росла интенсивнее на 41,88% относительно контрольного, второго и третьего опытного вариантов. Это, по-видимому, обусловлено пролонгированным действия rIL-2 в низких дозах при многократном, пероральном введении препарата. Однако, при анализе К(ф) особых различий между группами не зарегистрировано.

Результаты исследования показали (таблица 10), что под воздействием контактного стресса в крови всей молоди белуги, участвующей в эксперименте, происходили достоверные изменения ряда гематологических показателей в течение всего периода эксперимента.

В первые две недели отмечено повышение уровня гемоглобина на 18,60, 24,80, 18,28 %, соответственно в контроле опыт 1, 2, по отношению к первоначальным показателям. При этом, исключением были особи опыта 3, которым однократно в корм был внесен Ронколейкин в дозе 6 тыс.ед./кг массы тела. К концу эксперимента у особей из всех групп рыб этот показатель практически был равен первоначальным значениям. Однако, количество эритроцитов в крови снизилось относительно первоначальных показателей на 47,27; 62,29; 37,83; 20,27 %, соответственно по группам контроль, опыт 1, опыт 2, опыт 3. Что свидетельствует о процессах истощения депонированного резерва этих клеток под воздействием регулярного хендлинга. При этом, концентрация гемоглобина в одном эритроците была выше чем в начале эксперимента на 32,92; 38,93; 25,82; 21,88%, соответственно по группам рыб (таблица 10)

Таблица 10- Гематологические показатели молоди белуги

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

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

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

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

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

Наиболее существенные изменения зарегистрированы со стороны клеточного иммунитета. В самом начале эксперимента в лейкоцитарной формуле молоди белуги отмечен ярко выраженный гранулоцитоз, обусловленный эозинофилией (таблица 11).

Таблица 11 - Лейкоцитарная формула молоди белуги (%)

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

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

В дальнейшем у рыб из опытных групп отмечено уменьшение числа эозинофилов в крови в среднем в 2,06 раза относительно первоначальных показателей, а в абсолютном значении на 168,69; 213,65; 211,54%, соответственно по группам опыт 1, опыт 2, опыт 3 и увеличение абсолютной численности лимфоцитов в среднем в 1,5 раза. У контрольных особей абсолютное число эозинофилов снизилось на 58,23%, при $p<0,05$. При этом, обнаружены различия по абсолютному количеству лимфоцитов между группой контроля и опытом 1 при $p<0,05$.

К двадцать восьмым суткам у рыб из контрольной группы на фоне снижения абсолютного числа клеток иммунного надзора - лимфоцитов на

30,8%, происходило снижение и других клеток белой крови, выполняющих цитотоксические функции, в том числе эозинофилов на 27,8%, сегментоядерных нейтрофилов на 50,0%, относительно первоначальных показателей, что свидетельствует о явных иммунологических нарушениях. Данные показатели у молоди белуги из опытных групп, также имели тенденцию к снижению, но изменения были менее ощутимы по сравнению с опытом.

При оценке ЛКТ выявлено, что на протяжении всего эксперимента у особей из контрольной группы СКЦ был нестабилен и к концу эксперимента снизился на 14,7% относительно первоначальных показателей. Тогда как у рыб из группы рыб, которым был перорально трехкратно введен rIL-2 в дозе 2 тыс.ед./кг массы тела СЦК возрос на 53,4%, у молоди из второй и третьей опытных групп на 45,83 и 53,78. При этом различия между СЦК рыб из контрольного и всех опытных вариантов были существенными ($p<0,05$). Коэффициент корреляции данного показателя и количеством лимфоцитов в крови составил 0,83.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

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

При исследовании гематологических, физиолого-иммунологических и биологических показателей молоди русско-сибирского осетра, обнаружено, что повышение температуры воды выше оптимальных рыбоводно-нормативных значений сказывается на физиологическом статусе данного гибрида, т.е. происходит ослабление защитных функций, касающихся клеточного иммунитета и существует риск возникновения заболевания у молоди осетровых рыб. В результате применения Ронколейкина в качестве иммунокорректора при неблагоприятном температурном режиме отмечено, что rIL-2

способствует усилению эритропоэза, особенно в дозе 300 тыс. ед./100 л., и в дозах 300 и 400 тыс.ед./100 л оказывает наибольшее стимулирующее влияние на выработку иммуноглобулинов.

Проведенные нами исследования показали, что увеличение времени контакта с рыбой и усложнение манипуляций с молодью белуги способствует снижению концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови рыб, а также, приводит к серьезным нарушениям в лейкопоэзе. Кроме того, снижается способность палочкоядерных нейтрофилов к фагоцитозу. При этом, довольно в короткий срок, создаются предпосылки для развития вторичного иммунодефицита и возникновения секундарных заболеваний у рыб. Пероральное применение Ронколейкина при подготовке рыбы к рыбоводным манипуляциям, способствует коррекции соотношения форменных элементов, сохранению лимфоидного характера крови осетровых рыб. Показано что реакция организма рыб на Ронколейкин судя по физиолого-иммунологическим показателям крови отмечается уже на 7-е сутки от начала терапии, а клинически - в среднем на 10-е, 15-е сутки.

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

ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что на различных этапах рыбоводного процесса существует риск возникновения заболевания рыб, связанный с развитием вторичных иммунодефицитных состояний.

2. Показано, что влияние rIL-2 на физиологическое состояние осетровых рыб и их гибридов разных возрастных групп имеет дозозависимый характер.

3. Доказано, что механизм действия rIL-2 на физиологический статус осетровых рыб не зависит от их видовых особенностей.

4. Выявлено, что rIL-2 способствует активной регенерации поврежденных тканей осетровых рыб при хирургической травматизации и более ранним срокам репарации.

5. Обнаружено, что под влиянием rIL-2 происходит увеличение числа эритроцитов и лейкоцитов в крови, что свидетельствует о стимуляции функциональной активности гемопоэза, а также в определенных дозах оказывает стимулирующее влияние на выработку иммуноглобулинов.

6. Зарегистрировано позитивное влияние rIL-2 на клеточный иммунитет в первую очередь на активную пролиферацию лимфоцитов и восстановление фагоцитарной функции нейтрофильных гранулоцитов осетровых рыб и их гибридов.

7. Выявлено, что rIL-2, оптимизируя обменные процессы организма и стимулируя иммунную систему, способствует быстрому и значительному соматическому росту у осетровых рыб младших и средних возрастных категорий даже в постоперационный период.

8. Обнаружено, что рекомбинантный интерлейкин дает терапевтический эффект приблизительно на седьмой день с пролонгацией такового до 15-45 суток в зависимости от дозы, метода введения, а также причины иммунокоррекции.

9. Доказано, что воздействие рекомбинантного интерлейкина-2 (rIL-2) на организм осетровых рыб имеет общие черты и функциональное сходство, как и при его воздействии на организм теплокровных животных.

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

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

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

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

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

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

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

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

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

5. Касаева С.Ю., Федосеева Е.А Влияние рекомбинантного интерлейкина-2 на физиологические показатели гибрида белуга х стерлядь (бестер) после хирургического вмешательства для оценки развития гонад// Вестник Астраханского Государственного университета. Астрахань: Изд-во АГУ, №4 (39).- 2007.- С.-

6. Касаева С.Ю., Федосеева Е.А. Физиолого-иммунологические аспекты сохранения биоразнообразия осетровых рыб//

7. Касаева С.Ю., Судакова Н.В., Савенкова Е.Н., Смирнов М.Н., Островский М.В. Изучение действия RIL-2 на физиологические показатели молоди белуги (HUSO HUSO) в условиях систематического хендлинга.// Вопросы рыболовства

8. Касаева С.Ю., Судакова Н.В., Савенкова Е.Н. Влияние рекомбинантного интерлейкина -2 (rIL-2) на показатели белой крови производителей стерляди после хирургического вмешательства//

9. Касаева С.Ю., Савенкова Е.Н Влияние систематического хендлинга на некоторые физиолого-иммунологические показатели молоди белуги (HUSO HUSO)//

10. Судакова Н.В., Касаева С.Ю. Письменная О.А., Савенкова Е.Н. Иммунокоррекция русско-сибирского осетра при неблагоприятном температурном режиме//

11. Федосеева Е.А., Касаева С.Ю., Астафьева С.С.

12. Касаева С.Ю., Судакова.Н.В., Савенкова Е.Н., Смирнов М.Н., Островский М.В. Способ реабилитации рыб после хирургического вмешательства. - Заявка на выдачу патента на изобретение №2007117985, приоритет от 16 мая 2007.