

*Материалы Второй Международной конференции
по проблемам патологии, иммунологии и
охраны здоровья рыб и других гидробионтов (в печати).*

ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА -2 (rIL-2) НА ПОКАЗАТЕЛИ БЕЛОЙ КРОВИ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ СТЕРЛЯДИ ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА

Касаева С.Ю., Судакова Н.В., Савенкова Е.Н.
ФГУП ННЦ по осетроводству «БИОС».

В настоящее время разработано достаточно много методов и препаратов, направленных на предупреждение и лечение заболеваний рыб в условиях аквакультуры. Относительно быстрый эффект, достигаемый использованием химиопрепаратов в борьбе с инфекционными заболеваниями рыб, их доступность и простота применения, привели к широкому внедрению в рыбоводство антибиотиков, сульфаниламидов и антисептиков нитрофуранового ряда, как с лечебной, так и профилактической целью. Однако, использование антибактериальных препаратов может быть оправдано только в случаях действительно бактериальной инфекции, а также чувствительности возбудителя к данному препарату, подтвержденных лабораторным путем. Кроме того, многие антибиотики оказывают отрицательное влияние на естественные факторы иммунитета. Так, левомецетин, полимиксин, вибромицин, ампициллин угнетают опсонофагоцитарную систему иммунитета, осложняя течение гнойно-септических процессов. Гентамицин вызывает значительное угнетение реакций гуморального иммунитета: активности антителобразования на 72% и образования комплексов антиген-антитело на 79% и т.д. [1], а окситетрациклин вызывает у осетровых рыб выраженную эозинофилию, свидетельствующую о аллергизации [2]. В аквакультуре также применяют вещества, обладающие иммуностимулирующими свойствами: глюкан, хитин, лактоферрин и левамизол. Кроме того, иммуностимулирующий эффект может возникать при использовании витаминов В, Е, С, гормона роста, пролактина и трийодтиронина. Однако, применение некоторых препаратов, в том числе обладающих иммуностимулирующим действием, может иметь некоторые ограничения и порой вполне объективные. Так, все препараты, перечисленные выше, невозможно применять при отсутствии питания у рыб, так как они используются в качестве добавок в корм.

В связи с этим особую актуальность приобретает профилактика и лечебная терапия экологически чистыми, безопасными для человека медикаментозными средствами группы иммуномодуляторов, обладающих как иммуностимулирующими, так и иммуносупрессивными свойствами, причем на определенных этапах рыбоводного процесса, когда применение других препаратов невозможно по каким-либо причинам [2; 3; 4].

Экспериментальную работу с производителями стерляди проводили на производственной базе ФГУП ННЦ «БИОС» с 10.05.06 по 13.06.06 г. Для постановки эксперимента были сформированы 3 группы рыб, средняя масса которых составляла 1,47 кг. Созревание икры стимулировали двукратной инъекцией синтетического аналога гонадотропин - рилизинг гормона ЛГ-РГ- люлюберина «Сурфагон» (Мосагроген, Россия). Прижизненное получение овулировавшей икры у производителей осуществляли методом С.Б. Подушки (1996). В группе «опыт 1» 10-ти рыбам после проведения операции вводили рекомбинантный интерлейкин-2 (rIL-2) в дозе 3000 ед./кг массы тела; группе «опыт 2» 11-ти рыбам - 5000 ед./кг. rIL-2 вводили подкожно, двукратно с интервалом между инъекциями 24 часа, непосредственно после взятия крови из хвостовой вены. Самкам стерляди из группы «контроля» (10 экз.) после операции не вводили каких-

либо препаратов. Все рыбы имели индивидуальные метки, которые закреплялись на первом костном луче грудных плавников, кроме того, для страховки индивидуального мечения дополнительно пробивали плавники.

Перед оперативным вмешательством у производителей определяли размерно-весовые показатели, и был проведен клинический осмотр. Взятие крови от рыб трех групп осуществляли прижизненно, пункцией хвостовой вены, за 10 дней до оперативного вмешательства, непосредственно после получения половых продуктов и через 7, 14 суток, после инъектирования Ронколейкином.

Микроскопия мазков крови подопытных производителей стерляди показала, что в начале эксперимента лейкограммы рыб были в пределах физиологических норм и относительно идентичны, так как достоверных различий не выявлено (таблица 1).

Таблица 1.

Лейкоцитарная формула производителей стерляди в условиях эксперимента (%)

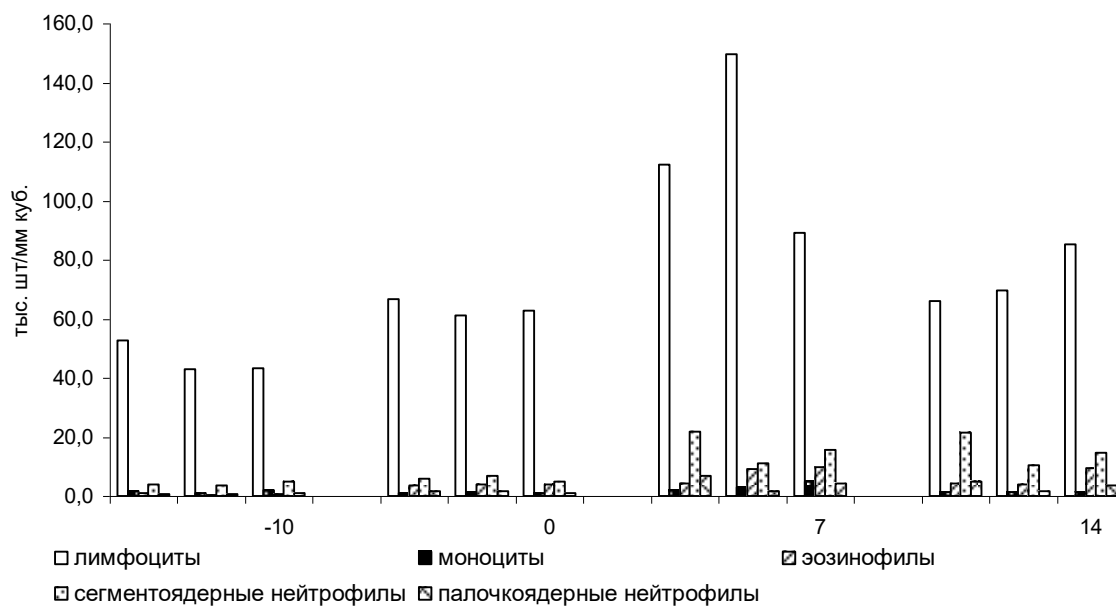
Вариант	Сутки	Лимфоциты	Моноциты	Эозинофилы	Сегментоядерные нейтрофилы	Палочкоядерные нейтрофилы
Опыт 1	-10	77,42±2,59	2,33±0,93	1,25±0,48	5,92±1,63	13,08±1,85
Опыт 2		73,85±2,74	1,95±0,37	0,80±0,30	6,15±0,91	17,25±2,28
Контроль		70,01±6,77	3,20±0,64	1,00±0,22	8,00±1,72	17,79±5,25
Опыт 1	0	61,75±9,40	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 достоверны (p<0,05)

Однако, при анализе мазков обнаружено, что 72±6,8% эозинофилов были деградированными, т.е при сохранении целостности клеточной стенки количество эозинофильного катионного белка было крайне низким, что свидетельствует о наличии цитотоксического эффекта. Несмотря на это, соотношение клеточных элементов белой крови было в пределах физиологической нормы. Об относительной физиологической норме можно говорить на основании всех приведенных гематологических, физиолого-иммунологических данных и ихтиопатологического осмотра. В дооперационный период лейкоцитарный профиль у производителей стерляди характеризовался явным доминированием лимфоцитов - 52,6; 42,8; 43,4 тыс.шт./мкл и крайне низким количеством эозинофилов - 0,9; 0,5; 0,6 тыс.шт./мкл, соответственно по группам рыб (опыт 1), (опыт 2) и контроль.

На нулевые сутки по данным лейкограмм наблюдали достоверное (p<0,05) перераспределение профиля в сторону нейтрофилии у всех групп оперированных особей, при этом основную долю нейтрофильных гранулоцитов составляли палочкоядерные формы. 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 (рисунок 1).



Примечание – «*» - различия достоверны ($p < 0,001$); 1 - (опыт1); 2 - (опыт 2); 3- контроль

Рисунок 1 - Лейкоцитарный профиль крови стерляди в условиях эксперимента в тыс.шт/мкл.

Также увеличилось содержание эозинофилов у рыб из первой опытной группы в 2,6 у второй - 5,3, у контрольных в 4,2 раза, а в абсолютном значении количество этих клеток возросло до 3,3; 4,0 и 3,8 тыс.шт./мкл, соответственно. Несмотря на то, что анализ лейкограмм свидетельствует о снижении относительного числа лимфоцитов в первом и во втором опытных вариантах в 1,3 и 1,2 раза, а в контроле оно осталось почти на прежнем уровне, их абсолютное количество возросло на 8,5; 29,9; 30,9%, соответственно по группам. Абсолютное количество моноцитов в крови несколько снизилось в среднем с 1,5 до 1,1 тыс.шт./мкл.

На седьмой день исследований в лейкоцитарной формуле у рыб из группы, 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 форм 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. Это, по-видимому, объясняется усилением воспалительной реакции после хирургического вмешательства. 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 опытных групп. Видимо у рыб группы контроля был инфекционный процесс, поэтому и происходила активация моноцитарно-макрофагального комплекса. Активная пролиферация лимфоцитов у рыб из первого и второго опытных вариантов, вероятно, обусловлена активным влиянием ключевого цитокина (IL-2).

К четырнадцатым суткам картина лейкоцитарной формулы сохранялась, но отмечено снижение абсолютного числа лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов, палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов практически до первоначальных показателей. При этом, у рыб из группы контроля зарегистрировано превышение числа эозинофилов в среднем на 43,2%, лимфоцитов - на 20,5% относительно опытных групп. Таким образом, анализ лейкоцитарной формулы крови стерляди подтверждает

более раннюю регенерацию поврежденных тканей яйцеводов после оперативного вмешательства у производителей, которым двукратно был введен иммуномодулятор в дозе 5 тыс.ед./кг массы тела.

Для оценки способности палочкоядерных нейтрофилов к фагоцитозу был проведен лизосомально-катионный тест, в котором определяли содержание лизосомальных катионных белков (ЛКБ) по среднему цитохимическому коэффициенту (СЦК).

В начале эксперимента состояние производителей стерляди по среднему цитохимическому коэффициенту было оценено в 4 балла (хорошо).

Таблица 2

Лизосомально-катионный тест нейтрофилов в крови производителей стерляди в условиях эксперимента

Вариант	сутки			
	-10	0	7	14
контроль	0,73±0,04	0,64±0,08	0,50±0,05*	0,51±0,07*
Опыт 1	0,68±0,09	0,70±0,09	0,57±0,07*	0,58±0,07*
Опыт 2	0,65±0,04	0,67±0,05	0,77±0,06*	0,75±0,05*

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

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. Состояние производителей стерляди из этих групп был оценен в 3 балла (удовлетворительно). Коэффициент корреляции между СЦК ЛКТ нейтрофилов и уровнем лимфоцитов в крови производителей стерляди составил - 0,79.

Таким образом, обнаружено, что влияние rIL-2 на показатели белой крови производителей осетровых рыб имеет дозозависимый характер. Показано, что rIL-2 способствует активной регенерации поврежденных тканей осетровых рыб при хирургической травматизации и более ранним срокам репарации. Зарегистрировано позитивное влияние rIL-2 на клеточный иммунитет в первую очередь на активную пролиферацию лимфоцитов и восстановление фагоцитарной функции нейтрофильных гранулоцитов осетровых рыб. Координируя межклеточные взаимодействия, он обеспечивает повышение устойчивости к вторичным инфекциям.

1. Виденин В.Н. Антисептики и антибиотики в оперативной хирургии// Ветеринария – Вып. 9.- 2004.- С. 46-53
2. 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.
3. Касаева С.Ю., Судакова Н.В. К вопросу о необходимости осуществления санитарно-профилактических мероприятий при индустриальном выращивании осетровых рыб// Весник Кабардино-балкарского университета. Серия Биологические науки - Вып.7 – Нальчик: Каб. – Балк. ун-т., 2005.- С.104-107.
4. Касаева С.Ю. Письменная О.А., Савенкова Е.Н. Основные периоды иммунокоррекции 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.

ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА -2 (rIL-2) НА ПОКАЗАТЕЛИ БЕЛОЙ КРОВИ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ СТЕРЛЯДИ ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА

Касаева С.Ю., Судакова Н.В., Савенкова Е.Н.
ФГУП ННЦ по осетроводству «БИОС»

В статье представлены данные показателей белой крови производителей стерляди до и после получения половых продуктов прижизненным методом. Показано влияние рекомбинантного интерлейкина -2 (rIL-2) на перераспределение соотношения лейкоцитов в крови рыб и изменение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов, характеризующих раннюю репарацию тканей после хирургического вмешательства. Определено позитивное влияние (rIL-2) на организм производителей стерляди посредством стимуляции пролиферации клеток иммунного контроля.