

61:02-3/1125-2

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

---

Биологический факультет

*На правах рукописи*

УДК 597-11

КИТАШОВА Александра Анатольевна

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

Специальность

03.00.10 – ихтиология, 14.00.36 – аллергология и иммунология

Диссертация

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель

кандидат биологических наук  
доцент Кондратьева И.А.

Москва – 2002

# СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений и обозначений	4
1. Введение	5
2. Обзор литературы	12
2.1. Органы и ткани иммунной системы рыб	12
2.1.1. Почка	12
2.1.2. Тимус	14
2.1.3. Селезенка	17
2.1.4. Скопления лимфоцитов, ассоциированные со слизистыми оболочками внутренних органов	18
2.1.5. Ткань эпикарда	20
2.1.6. Краниальный гемопозитический орган	20
2.1.7. Периферическая кровь	22
2.2. Клетки иммунной системы рыб	23
2.2.1. Гранулоциты	23
2.2.2. Макрофаги	24
2.2.3. Неспецифические цитотоксические клетки	25
2.2.4. Лимфоциты	26
2.3. Факторы гуморального иммунитета рыб	28
2.3.1. Факторы врожденного иммунитета	28
2.3.2. Факторы приобретенного иммунитета	34
2.4. Развитие иммунного ответа	39
2.4.1. Первичный и вторичный иммунный ответ, формирование специфической памяти	39
2.4.2. Трансплантационные реакции	43
2.4.3. Реакции гиперчувствительности	44
2.4.4. Противоопухолевая активность	45
2.5. Регуляция иммунной системы	45
2.6. Болезни рыб	54
2.6.1. Краткая характеристика болезней рыб	54
2.6.1.1. Инфекционные заболевания	55
2.6.1.2. Инвазионные заболевания	57
2.6.1.3. Болезни смешанного типа	58
2.6.2. Методы профилактики и лечения заболеваний рыб	59
2.6.2.1. Использование химиотерапевтических препаратов	59
2.6.2.2. Вакцинация	62
2.6.2.3. Пассивная иммунизация	64
2.6.2.4. Повышение иммунитета путем селекции	64
3. Цель и задачи исследования	66
4. Объекты и методы исследования	67
4.1. Объекты	67
4.1.1. Радужная форель <i>Salmo gairdneri</i> (Richardson, 1836)	67
4.1.2. Северная навага <i>Eleginus navaga</i> (Pallas, 1811)	67
4.1.3. Беломорская треска <i>Gadus morhua maris-albi</i> (Derjugin, 1920)	67
4.2. Методы	67
4.2.1. Отлов и содержание морских рыб	67
4.2.2. Клинический осмотр рыб	68
4.2.3. Вскрытие рыб и осмотр при вскрытии	68
4.2.4. Бактериологическое исследование	68
4.2.5. Паразитологическое исследование	69
4.2.6. Взятие крови и получение сыворотки	69
4.2.7. Подсчет форменных элементов крови	69
4.2.8. Определение скорости оседания эритроцитов	70
4.2.9. Определение концентрации гемоглобина в крови	70
4.2.10. Определение цветного показателя крови	70
4.2.11. Двуступенчатый электрофорез сывороток крови рыб в полиакриламидном геле, содержащем додецил-сульфат натрия, в восстанавливающих условиях	71
4.2.12. Компьютерная обработка электрофореграмм	71
4.2.13. Определение концентрации лизоцима в сыворотке	73
4.2.14. Выделение иммуноглобулинов	74

4.2.15.	Определение концентрации белка по методу Бредфорд	74
4.2.16.	Спектрофотометрическое определение концентрации белка	75
4.2.17.	Получение антисыворотки	75
4.2.18.	Получение разрушенных клеток бактерий	75
4.2.19.	Твердофазный иммуноферментный анализ	76
4.2.19.1.	Непрямой твердофазный ИФА для тестирования антисыворотки кролика к иммуноглобулинам рыб	76
4.2.19.2.	Прямой твердофазный ИФА для стандартизации рабочего разведения конъюгата	78
4.2.19.3.	Непрямой твердофазный ИФА для стандартизации рабочей концентрации иммуноглобулинов кролика	78
4.2.19.4.	Непрямой твердофазный ИФА для стандартизации рабочего разведения клеток бактерий	78
4.2.19.5.	Непрямой твердофазный ИФА для стандартизации рабочей концентрации разрушенных ультразвуком клеток бактерий	78
4.2.19.6.	Непрямой твердофазный ИФА для определения взаимодействия сывороток рыб с поверхностными антигенами бактерий	79
4.2.19.7.	Непрямой твердофазный ИФА для определения взаимодействия сывороток рыб с антигенами разрушенных ультразвуком клеток бактерий	79
4.2.19.8.	Получение данных с помощью компьютера	79
4.2.20.	Статистическая обработка данных	80
5.	Экспериментальные результаты и их обсуждение	81
5.1.	Исследование параметров врожденного иммунитета радужной форели, наваги и трески в зависимости от инфекции и зараженности паразитами	82
5.1.1.	Изучение иммунологических и гематологических показателей радужной форели при энтерите и исследование действия лекарственных препаратов	83
5.1.1.1.	Клинический осмотр и патологоанатомическое исследование	86
5.1.1.2.	Бактериологический анализ	89
5.1.1.3.	Паразитологический анализ	89
5.1.1.4.	Изучение гематологических показателей	89
5.1.1.5.	Сравнение электрофореграмм сывороток рыб	92
5.1.1.6.	Определение концентрации лизоцима в сыворотках рыб	94
5.1.2.	Исследование зависимости иммунологических и гематологических показателей наваги и трески Белого моря от зараженности паразитами	97
5.1.2.1.	Морфологические параметры рыб	99
5.1.2.2.	Показатели зараженности рыб скребнем <i>Echinorhynchus gadi</i>	102
5.1.2.3.	Бактериологический анализ	104
5.1.2.4.	Изучение гематологических показателей	104
5.1.2.5.	Определение концентрации белка в сыворотках рыб	110
5.1.2.6.	Сравнение электрофореграмм сывороток рыб	112
5.1.2.7.	Определение концентрации лизоцима в сыворотках рыб	112
5.2.	Исследование специфического иммунитета радужной форели	118
5.2.1.	Оптимизация метода твердофазного иммуноферментного анализа и экспериментальная разработка тест-системы для изучения специфического взаимодействия сывороток рыб с возбудителями заболеваний	120
5.2.1.1.	Выделение иммуноглобулинов из сыворотки рыб	121
5.2.1.2.	Получение поликлональной антисыворотки и поликлональных антител кролика к иммуноглобулинам рыб	123
5.2.1.3.	Подбор условий для проведения твердофазного ИФА	125
5.2.2.	Применение метода твердофазного иммуноферментного анализа для определения специфического взаимодействия сывороток рыб с возбудителями энтерита радужной форели	133
6.	Заключение	137
7.	Выводы	142
	Литература	144

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

2-МЭ	2-меркаптоэтанол
БСА	бычий сывороточный альбумин
ДСН	додecil-сульфат натрия
ДЭАЭ	диэтиламиноэтил
ИФА	иммуноферментный анализ
МНС	главный комплекс гистосовместимости
МПА	мясопептонный агар
МПБ	мясопептонный бульон
ОФД	дигидрохлорид орто-фенилендиамин
ПААГ	полиакриламидный гель
ПДГ	среда, содержащая пептон, дрожжевой экстракт и глюкозу
ПСА	персульфат аммония
СОЭ	скорость оседания эритроцитов
ТЕМЭД	N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
Трис	тригидроксиметиламинометан
HCl	1 М раствор соляной кислоты
IgM	иммуноглобулин класса М

# 1. ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в связи с развитием рыбоводства и увеличением промысловой добычи рыбы в пресноводных водоемах, морях и океанах возрос интерес к изучению иммунной системы и иммунного ответа у рыб. Исследования иммунитета рыб можно разделить на три основных категории.

## *1. Сравнительные и эволюционные исследования*

Изучение иммунной системы рыб внесло существенный вклад в развитие сравнительной и эволюционной иммунологии. Галактионов указывает: «на эволюцию специфического иммунитета не следует смотреть только как на самостоятельное явление исторического развития; скорее, ее следует оценивать как такой процесс, который обеспечил прогресс в мире животных по линии увеличения абсолютного количества соматических клеток» [Галактионов, 1998, с. 391]. Первые исследования, связанные со строением органов иммунной системы рыб, относятся к 1920-м – 1940-м годам: например, труд Г.Н. Калашникова (1939) посвящен клеточному составу крови рыб, работа А.К. Скворцова (1947) — строению селезенки костистых рыб. Позднее появились труды Zapata о структуре лимфоидных органов рыб [Zapata, 1979; 1980] и Ellis, посвященные функционированию лейкоцитов рыб [Ellis, 1977; 1980; 1986]. В 1990-х годах в связи с разработкой новых методов, таких как иммунохимические методы, гибридная технология, анализ ДНК и генно-инженерные технологии, ученые стали уделять большое внимание молекулярным механизмам иммунитета [Cadwell et al., 1990; Bengten et al., 1991; Abelli et al., 1996; 1997; 1999; Scapigliati et al., 1999a; Secombes et al., 1999]. Исследования иммунной системы прояснили эволюционное положение

рыб и внесли вклад в понимание структурного и функционального становления системы иммунитета млекопитающих. Так, было показано, что рыбы наряду с врожденным иммунитетом, свойственным и низкоорганизованным животным, обладают всеми основными элементами специфической иммунной системы высших позвоночных, но различные регуляторные механизмы иммунного ответа у рыб менее развиты.

Однако до сих пор нет целостной картины организации и функционирования иммунной системы рыб. Основной причиной недостаточности знаний является противоречивость накопленных данных, обусловленная, прежде всего, большими различиями между классами и группами рыб: ДНК хрящевых и костистых рыб отличаются по степени гибридизации больше, чем ДНК птиц и млекопитающих [Медников и др., 1973].

## *2. Исследования, связанные с промышленным разведением рыб*

При разведении рыб в аквакультуре условия их содержания должны благоприятствовать оптимальной активности врожденного иммунитета. В этом направлении были проведены исследования влияния условий содержания на параметры иммунитета рыб. Было показано, что иммунитет рыб в значительной мере зависит от внешних воздействий, и условия среды обитания представляют собой активные регуляторы иммунореактивности рыб.

Современное рыбоводство является неотъемлемым звеном экономического развития России. В последние годы научная база рыбоводства существенно расширилась, однако до сих пор заболевания рыб и способы их лечения изучены недостаточно, и рыбные хозяйства несут большие экономические потери от

смертности рыб вследствие болезни. Наиболее эффективным методом контроля заболеваний рыб, вызываемых характерными для аквакультуры патогенами, является вакцинация рыб. Применяют также различные лекарственные препараты, но нет данных о сравнительной эффективности этих средств. Существуют ограничения для успешного применения этих методов, поскольку использование лекарств связано с риском загрязнения ими среды обитания, а вакцина дает защиту только от специфического инфекционного агента, в случае появления новых болезней требуется разработка новых вакцин. Поэтому проводятся исследования, с одной стороны, вирулентности и патогенности бактерий, характерных для рыб, содержащихся в рыбных хозяйствах, изучение этиологии и биологии паразитов рыб, а с другой стороны — факторов, влияющих на иммунный ответ рыб и усиливающих его. Изучаются возможности применения иммуностимулянтов — эволюционно консервативных веществ, свойственных микроорганизмам и стимулирующих реакции врожденного иммунитета у животных. Кроме того, изучаются возможности селективного разведения устойчивых к заболеваниям рыб. Наконец, перспективными представляются разработка и производство простых в применении, надежных и высокочувствительных тест-систем для диагностики болезней рыб.

### *3. Изучение показателей иммунитета рыб как биоиндикация состояния водной среды обитания*

В последнее время в связи с ростом техногенного воздействия на среду обитания и возникновением угрозы для выживания и здоровья живых организмов параметры иммунитета рыб используются как показатели загрязнения воды в реках,

озерах и морях. Наиболее широко используются такие иммунные параметры, как концентрация лизоцима, антител и лейкоцитов в крови рыб, а также тесты функциональной активности комплемента, макрофагов и лимфоцитов. Поллютанты не только оказывают вредное воздействие на животных, но и нарушают естественное развитие экосистемных процессов. Поллютанты могут подавлять функции иммунной системы рыб или приводить к развитию реакций гиперчувствительности и аутоиммунных реакций из-за дисфункции механизмов регуляции иммунной системы, тем самым участвуя в нарушении гомеостаза организма рыб [Cossarini-Dunier et al., 1990; Hart et al., 1997; Baumann, 1998; O'Halloran et al., 1998; Aaltonen et al., 2000; Dethloff et al., 2001; Regala et al., 2001]. В результате наблюдается увеличение количества заболевших рыб, возрастание интенсивности и экстенсивности зараженности рыб паразитами, изменение восприимчивости рыб к условно-патогенным симбионтам микрофлоры кишечника. Кроме того, загрязняющие вещества могут действовать как канцерогены [Grizzle et al., 1981; Baumann, 1998]. Оценка параметров иммунной системы морских и пресноводных рыб позволяет получать достоверную информацию о состоянии животных в естественных условиях обитания и о качестве среды, а также проводить биотестирование и биомониторинг техногенного воздействия на среду обитания диких видов. Кроме того, учет симбионтов рыб (паразитов, бактерий) позволяет оценивать биоразнообразие в экосистемах и прогнозировать развитие протекающих в экосистемах динамических процессов. Влияние токсических веществ и других промышленных отходов на иммунную систему рыб стало предметом иммунотоксикологии.



Как известно, иммунная система представляет собой защитную систему, в результате действия которой поддерживается постоянство внутренней биологической среды организма, то есть развивается иммунитет<sup>1</sup> к чужеродным агентам молекулярной, надмолекулярной и клеточной организации, уничтожаются собственные измененные клетки и нейтрализуются продукты их жизнедеятельности. В иммунной системе позвоночных животных выделяют две основных составляющих — врожденную и приобретенную, каждая из них представлена клеточными элементами и продуцируемыми ими веществами — гуморальными факторами иммунитета [Ярилин, 1999].

Врожденная составляющая иммунной системы позвоночных формируется в процессе естественного развития организма, и механизмы, относящиеся к этой части иммунной системы, называют также естественными. Они начинают действовать сразу после любого воздействия, которое нарушает целостность внутренней среды организма, то есть являются неспецифическими. Действие врожденных механизмов иммунитета кратковременно и неизбирательно, то есть не зависит от уникальных особенностей активизировавшего защитные реакции чужеродного агента. При повторной встрече с чужеродным агентом клетки и гуморальные факторы естественного иммунитета не «узнают» его и реагируют на него так же, как и при первом контакте, то есть не происходит формирования иммунологической памяти. Это звено иммунитета позвоночных животных имеет много общих черт с защитными реакциями беспозвоночных [Фонталин, 1998].

Приобретенная составляющая иммунной системы позвоночных, или антигенраспознающая система, уникальна тем, что формирование этой системы

---

<sup>1</sup> от лат. *immunitas* — неприкосновенность

происходит в течение всей жизни организма в результате контакта с различными агентами — чужеродными или измененными собственными субстанциями, вызывающими в организме развитие специфических иммунных реакций. Эти реакции направлены только против агента, который активировал каскад иммунного ответа, поэтому приобретенную составляющую иммунной системы называют еще адаптивной. Основой ее являются лимфоциты, несущие на своей поверхности уникальные рецепторы, распознающие антиген и способные взаимодействовать с другими молекулами и клетками иммунной системы. Разнообразие этих рецепторов создается в результате действия генетических и отборочных механизмов, максимизирующих репертуар рецепторов, распознающих антиген, и одновременно минимизирующих риск реагирования на собственные нормальные антигены организма. Система приобретенного иммунитета позвоночных животных способна узнать чужеродный агент или собственные измененные клетки и макромолекулы, избирательно уничтожить их или нейтрализовать. Одновременно осуществляется запоминание этого агента, формируется специфическая иммунологическая память, и при повторном контакте с ним адаптивные механизмы реагируют более быстро, эффективно и продолжительно.

При развитии иммунного ответа составляющие иммунной системы позвоночных животных — клетки и гуморальные факторы естественного иммунитета и антигенраспознающей системы — действуют взаимосвязанно.

Организация иммунной системы большинства рыб уже во многом превосходит организацию иммунной системы высших позвоночных, и рыбы способны к проявлению всех форм иммунного ответа, свойственных

млекопитающим. Однако иммунная система рыб более лабильна и восприимчива к изменению внешних условий. С одной стороны, это приводит к тому, что в неблагоприятных условиях у рыб снижается устойчивость к условно-патогенным и непатогенным симбионтам и появляется риск заболевания инфекционными и инвазионными болезнями, вызванными этими организмами [Бауер и др., 1981; Юнчис, 2000]. С другой стороны, такая чувствительность иммунной системы рыб дает возможность разработки новых, более точных, быстрых и недорогих методов определения состояния среды обитания водных животных, воздействия техногенных факторов на живые организмы и характера их ответа [Криксунов и др., 1999; Смуров, 2000]. Иммунная система как система защиты организма от чужеродного воздействия является чрезвычайно чувствительной к токсическому действию химических веществ, присутствующих в очень низких концентрациях, которые не приводят к привычному «очевидно» вредному эффекту. Сегодня в результате экспансии человеческой деятельности практически на все природные зоны и нерационального отношения человека к окружающей природе многие иммунологические параметры рыб стали использоваться как биомаркеры для мониторинга иммунотоксичности химических загрязнителей сред обитания диких видов и для предсказания токсикологического риска, связанного с загрязнением водных сред. Таким образом, исследование показателей иммунной системы рыб не только представляет материал для выявления новых филогенетических связей между различными группами животных, но и служит решению практических задач, таких как эффективное промышленное разведение рыб, экологическое моделирование и достоверное предсказание изменений экологической обстановки биогеоценозов.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Иммунная система рыб представляет собой совокупность гуморальных факторов защиты и продуцирующих их клеточных элементов, которые могут составлять рециркулирующую популяцию клеток крови или быть организованными в тканевые и органые структуры.

### 2.1. Органы и ткани иммунной системы рыб

К органам и тканям иммунной системы рыб относят почку, тимус, селезенку, скопления лимфоцитов, ассоциированные со слизистыми оболочками внутренних органов, ткань эпикарда и краниальный гемопозитический орган древних и двоякодышащих рыб, а также периферическую кровь (рис. 1). Аналогов лимфоузлов у рыб не обнаружено.

#### 2.1.1. Почка

Почка рыб — универсальный орган кроветворения, в котором происходит дифференцировка, пролиферация и созревание клеток всех линий кровяной дифференцировки, в том числе и лимфоидной. Это показано во многих работах [Ellis, 1977; Zapata, 1979; Botham & Manning, 1981]. Считается, что почка — основной орган иммунной системы рыб, функционально схожий с костным мозгом высших позвоночных. Здесь завершается развитие В-лимфоцитов и начинается их функционирование [Irwin & Kaattari, 1986], что отличает лимфопозз рыб от лимфопозза млекопитающих, у которых зрелые В-лимфоциты функционируют чаще всего на периферии — в селезенке или лимфоузлах.

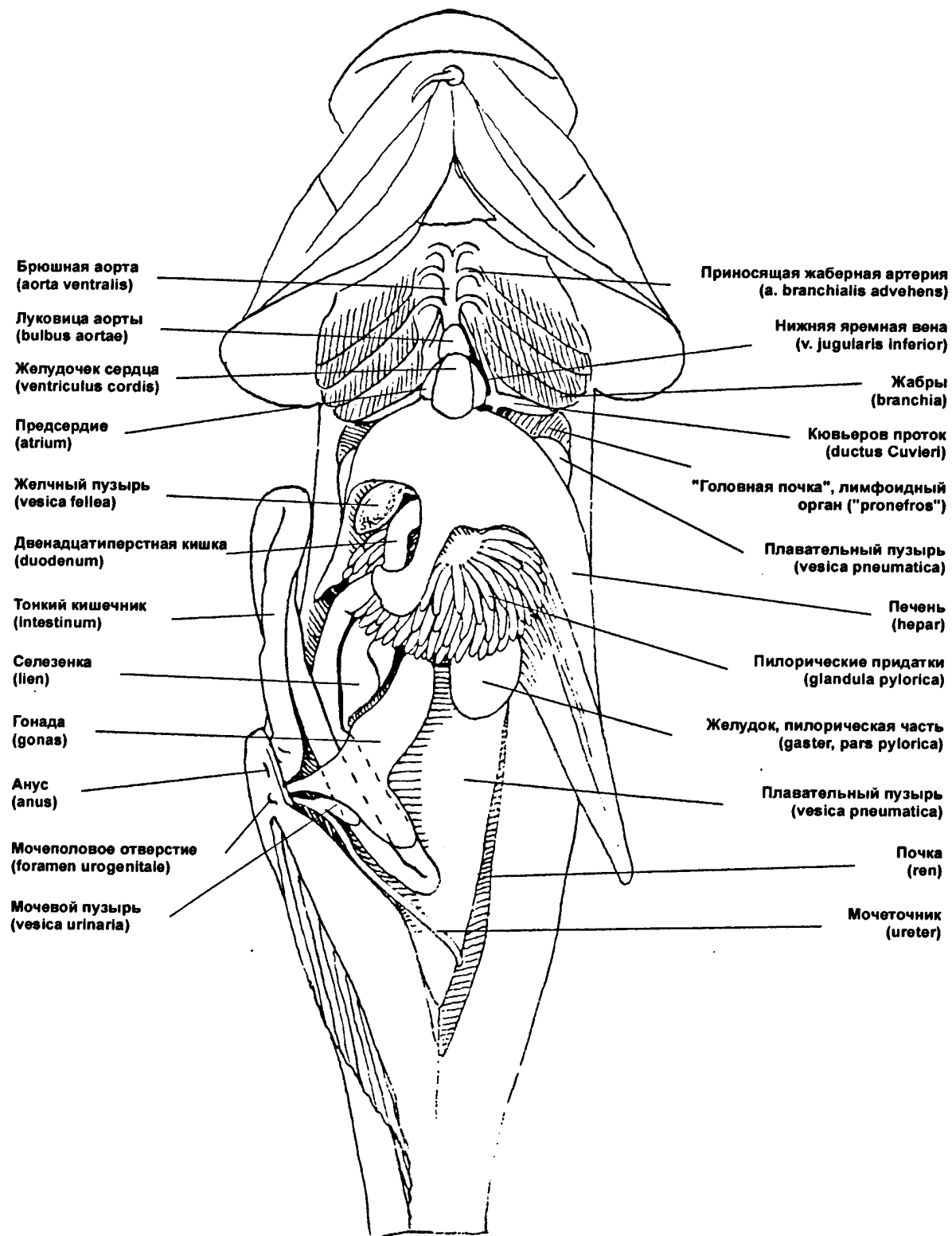


Рис. 1. Схематическое изображение внутренних органов рыбы (на примере *Gadus morhua*). Схема любезно предоставлена проф. Ф. Я. Держинским

В почке возможно осуществление всех стадий иммунного ответа независимо от других лимфоидных органов. В литературе описаны рассеянные в гемопоэтической ткани почки мелано-макрофагальные центры — агрегаты клеток, среди которых обнаружено значительное количество макрофагов. Авторы предполагают, что в этих центрах происходят такие процессы, как улавливание антигена макрофагами, его процессинг и представление лимфоцитам [Ellis, 1980].

Почка костистых рыб подразделяется на два отдела — пронефрос (передняя, или головная, почка) и мезонефрос (задняя, или туловищная, почка). Пронефрос на ранних этапах онтогенеза утрачивает экскреторную функцию и превращается в исключительно гемопоэтический и иммунный орган. Мезонефрос на протяжении всей жизни сочетает названные функции.

Наибольшая активность иммунных реакций наблюдается именно в головной почке. Так, выделенные из нее неспецифические цитотоксические клетки более активны *in vitro* в реакциях лизиса трансформированных клеток млекопитающих. В головной почке отмечена большая активность фагоцитирующих клеток, показано наличие и функционирование плазматических клеток — зрелых В-лимфоцитов, синтезирующих антитела [Гревати, 1991; Graves et al., 1984; Lamers & Parmentier, 1985].

### 2.1.2. Тимус

Тимус в эволюции впервые появляется у круглоротых. В дорсальной области жаберных карманов этих животных присутствуют лимфоидные скопления, отделенные от глоточной полости однослойным слизистым эпителием. В этих скоплениях созревают и пролиферируют клетки одной линии — лимфоциты [Ланге

и др., 1990]. Эти данные позволяют отождествлять лимфоидные скопления круглоротых с тимусом позвоночных.

У рыб тимус расположен поверхностно, в особых пазухах черепа в заглазничной области, отделяясь от глоточной полости тонкой слизистой стенкой (рис. 2), тогда как у высших позвоночных тимус находится глубоко от поверхности тела.

Морфологическое и гистологическое строение тимуса рыб, особенно костистых, похоже на строение тимуса млекопитающих. У костистых рыб наблюдается разделение паренхимы тимуса на корковую и мозговую зоны, причем показано, что пролиферация лимфоцитов происходит исключительно в корковом веществе [Золотова, 1989]. Тимус крупных долгоживущих рыб, как и тимус млекопитающих, разделен на дольки [Говядинова, 1998; Fange, 1986]. У рыб, как и у высших позвоночных, существует гемато-тимусный барьер.

Некоторые авторы называют тимус рыб центральным лимфоидным органом, так как именно в нем происходит лимфопоэз, а удаление тимуса (тимэктомия) у костистых рыб приводит к подавлению гуморального иммунного ответа и задержке отторжения трансплантата [Tatner, 1986]. С использованием автордиографической метки было показано, что тимоциты из тимуса направляются в почку и селезенку, причем миграция осуществляется в одном направлении и лимфоциты движутся не произвольно, а направляются к определенному месту в лимфоидном органе [Tatner, 1985]. Такая миграция лимфоцитов наблюдается и у млекопитающих.

В тимусе обнаружены и другие типы клеток, участвующих в работе иммунной системы. В ряде электронномикроскопических работ дано подробное

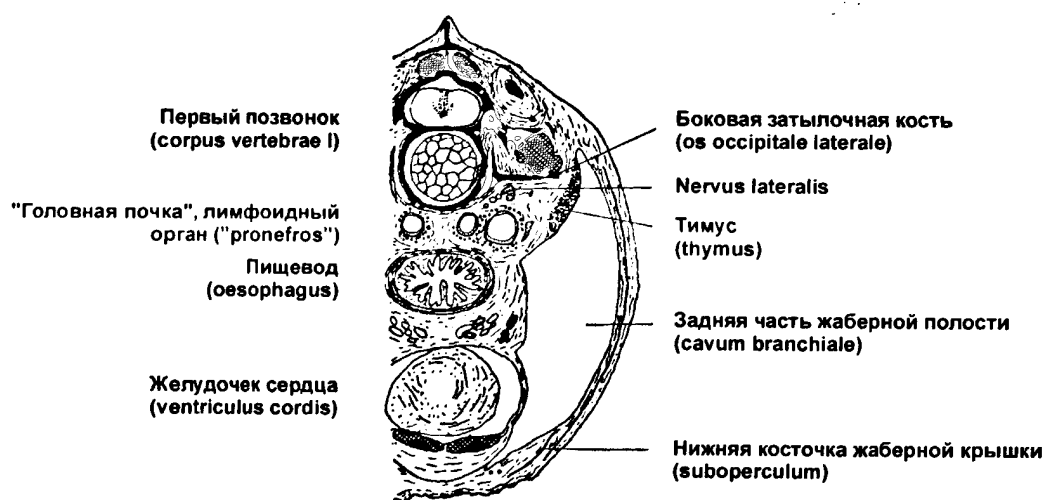


Рис. 2. Поперечный разрез рыбы в области сердца (на примере *Syngnathus*). Схема дана по Суворову (1948), с изменениями



описание системы микроокружения тимуса, или стромы тимуса. Обнаружены стромальные элементы, связанные десмосомами, что предполагает эпителиальную природу стромы тимуса, а также макрофаги, находящиеся в различных функциональных состояниях [Гревати, 1991; Chilmonczyk, 1983]. Спорным является вопрос об инволюции тимуса рыб, подобной возрастной инволюции тимуса млекопитающих [Chilmonczyk, 1983; Tatner, 1986].

### *2.1.3. Селезенка*

Литературные данные о функциях селезенки рыб противоречивы. Это, видимо, связано с тем, что в разных группах рыб этот орган может выполнять различные функции, как и у млекопитающих [Bloom & Fawsett, 1986].

Селезенка костистых рыб в отличие от таковой млекопитающих состоит только из красной пульпы, в которой есть отдельные лимфоидные скопления. После иммунизации количество лимфоцитов и плазматических клеток в селезенке увеличивается, хотя и менее значительно, чем в пронефросе [Secombes et al., 1982]. При удалении селезенки наблюдается уменьшение количества лимфоцитов в периферической крови, однако к подавлению иммунного ответа у рыб независимо от способа иммунизации спленэктомия не приводит [Mahajan & Dheer, 1982]. Таким образом, селезенка, хотя и относится к иммунным органам, в иммунитете рыб играет меньшую роль, чем почка и тимус.

В селезенке, так же как и в почке, обнаружены мелано-макрофагальные центры, но они более многочисленны и устроены сложнее [Agius, 1981]. В этих центрах депонируются антигены и иммунные комплексы. Однако, хотя в селезенке высших рыб и происходит развитие клеток моноцитоидной и лимфоидной линий

дифференцировки [Золотова, 1989; Гревати, 1991], основная роль селезенки — депонирование крови. Поэтому у многих видов костистых рыб селезенка остается преимущественно эритроидной [Van Muiswinkel et al., 1991].

У древних рыб селезенка более развита. Селезенка осетровых рыб [Fange, 1986], скатов [Zapata, 1980] и двоякодышащих рыб [Скворцов, 1947], как и селезенка млекопитающих, состоит из красной и белой пульпы с разным составом гемопоэтической крови, причем в белой пульпе обнаруживаются фолликулоподобные скопления лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов.

#### *2.1.4. Скопления лимфоцитов, ассоциированные со слизистыми оболочками внутренних органов*

У млекопитающих любой антиген прежде всего доставляется в лимфатические узлы, формирующие в организме густую сеть. У рыб лимфатических узлов нет, но пищеварительный тракт, в особенности его глоточный и кишечный отделы, содержит лимфоидную ткань. Скопление лимфоидной ткани в окологлоточной области служит барьером, охраняющим внутреннюю среду организма от содержащихся в фильтруемой воде патогенов. Такую же роль играют скопления лимфоцитов, ассоциированные с кишечником. Этот орган полностью открыт для попадающих в организм вместе с пищей чужеродных веществ, патогенных чужеродных и собственных микроорганизмов и паразитов, и поэтому должен быть защищен с помощью активных иммунных механизмов. В соединительнотканной пластинке слизистой оболочки пищеварительного тракта обнаружены многочисленные макрофаги, гранулоциты и отдельные лимфоциты, а также скопления лимфоцитов, выполняющие основную роль при иммунном ответе

на антигены, достигшие кишечника. Это показано в экспериментальных моделях с использованием антигенов, вводимых перорально: часто у рыб при иммунном ответе на такие антигены не наблюдается никаких изменений в титре антител в крови [Fichtelius et al., 1968; Fletcher & White, 1973; Hart et al., 1998].

Среди лимфоцитов слизистой оболочки кишечника преобладают Т-лимфоциты, тогда как В-лимфоциты остаются минорной фракцией, что показано во многих работах с помощью моноклональных антител, направленных к поверхностным маркерам тимоцитов и иммуноглобулинам [Abelli et al., 1997; Romano et al., 1997b; Rombout et al., 1998]. Более того, здесь обнаруживается большее количество Т-лимфоцитов, чем в почке и селезенке [Scapigliati et al., 1999a]. По направлению к конечным отделам кишечника количество лимфоцитов увеличивается. Это явление, возможно, связано с различными механизмами поглощения, транспорта и деградации антигенов, поступающих в желудочно-кишечный тракт [Lavelle & Harris, 1997].

В процессе онтогенеза рыб лимфоидная ткань, ассоциированная с кишечником, формируется очень рано: Т-лимфоциты обнаруживаются в ней вскоре после их обнаружения в тимусе и задолго до обнаружения в головной почке и селезенке, причем их количество в этих органах по сравнению с лимфоидной тканью кишечника остается небольшим [Abelli et al., 1996; Picchietti et al., 1997].

Было высказано мнение, что соединительная ткань желудочно-кишечного тракта и ассоциированные с ней лимфоидные скопления низших позвоночных животных представляют собой первый в эволюции пример формирования иммунной ткани [Fichtelius et al., 1968]. Matsunaga и Rahman развивают эту гипотезу

и связывают возникновение иммунной ткани и адаптивной составляющей иммунитета позвоночных с изменениями в системе пищеварения (появлением челюстей) и методах питания (переходом к хищничеству) [Matsunaga & Rahman, 1998]. Они приводят пример морского конька — представителя костистых рыб, у которого рот организован в виде сифоноподобной структуры и который не ведет хищнического образа жизни. Его кишечник представляет собой простую прямую трубку, практически лишенную лимфоидной ткани (рис. 3). Авторы предполагают, что такой образ жизни, не связанный с риском поранения кишечника и проникновения инфекции через пищеварительный тракт, сделал лимфоидную ткань, ассоциированную с кишечником, ненужной у этих рыб, и она была утрачена или значительно сокращена в ходе эволюции.

#### *2.1.5. Ткань эпикарда*

У некоторых рыб (у осетровых) обнаружены уникальные лимфоидные эпикардальные образования, содержащие ретикулоциты, большие и малые лимфоциты, гранулоциты и макрофаги. Таким образом, их гистологическое строение аналогично строению лимфатических узлов млекопитающих. Функции этих образований окончательно не выяснены, но авторы предполагают, что в них, как и в лимфатических узлах млекопитающих, может происходить фильтрация лимфы [Говядинова и др., 2000; Fange, 1986].

#### *2.1.6. Краниальный гемопоэтический орган*

У осетровых рыб в полостях черепа присутствует универсальный орган гемопоэза, гистологическое строение которого сходно со строением костного мозга млекопитающих [Говядинова и др., 2000; Fange, 1986]. По-видимому, краниальный



Рис. 3. Морской конек (*Hippocampus kuda*) и изолированный кишечник морского конька (указан стрелкой). Рисунок дан по Matsunaga, Rahman (1998)

гемопозитический орган осетровых — это первый в эволюции пример ассоциации кроветворной ткани и скелета, наблюдаемой у высших позвоночных.

### *2.1.7. Периферическая кровь*

Состав периферической крови здоровых рыб очень лабилен в зависимости от условий среды обитания. Однако четко прослеживаются общие закономерности: в основном, в белой крови преобладают лимфоциты. При воспалении состав клеток периферической крови изменяется вследствие миграции из кроветворных органов в периферическую кровь клеток моноцитоидной и лимфоидной линий кроветворения. В отличие от млекопитающих, у рыб при стимуляции кроветворения в крови обнаруживаются в значительном количестве малодифференцированные клетки, способные к размножению [Золотова, 1989; Хрущов и др., 1993]. Это явление наблюдается и у низших животных, таких как круглоротые [Ланге и др., 1987].

В иммунитете рыб гораздо большее значение, чем у наземных позвоночных, имеют *слизистые покровы кожи, дыхательных путей и пищеварительного тракта*. Слизь не только выполняет функцию механической защиты, но и обладает антимикробным действием за счет содержащихся в ней лизоцима, антимикробных пептидов, антител и других гуморальных факторов, обеспечивающих немедленную защиту организма от присутствующих в воде патогенов. При этом часто развитие иммунного ответа на антиген в слизи не совпадает с реакцией, развивающейся во внутренних органах, и в иммунологии рыб различают локальный (мукозальный) и системный (сывороточный) иммунные ответы [Rombout et al., 1989; Lumsden et al.,

1993; 1995; Ototake et al., 1996; Moore et al., 1998; dos Santos et al., 2001a; 2001b]. Matsunaga и Rahman считают формирование системы мукосального иммунитета на поверхности тела у рыб эволюционно более ранним этапом организации иммунной системы позвоночных животных, чем образование тимуса и других лимфоидных тканей, управляющих системным иммунитетом [Matsunaga & Rahman, 2001]. По их мнению, тимус является дополнительным уровнем организации, улучшающим работу иммунной системы низших позвоночных, представленной мукосальными реакциями кожи, дыхательных путей и пищеварительного тракта. Matsunaga и Rahman предполагают, что возникновение тимуса связано с развитием лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками, расположенными в области жабр первых позвоночных животных.

## 2.2. Клетки иммунной системы рыб

Иммунная система костистых рыб включает субпопуляции гранулоцитов, моноцитов и макрофагов, относящиеся к миелоидной линии дифференцировки стволовой клетки крови, а также субпопуляции лимфоидных клеток — неспецифические цитотоксические клетки, В- и Т-лимфоциты.

### 2.2.1. Гранулоциты

Среди гранулоцитов рыб преобладают *нейтрофилы*. Эти клетки одними из первых оказываются в зараженной бактериями ткани, они всегда многочисленны в зоне воспаления [Roubal, 1986]. Их основная функция — выделение веществ, которые, во-первых, привлекают в зону воспаления другие клетки (макрофаги, лимфоциты) и, во-вторых, способствуют элиминации бактерий [Verburg-van

Kemenade et al., 1994]. Кроме того, в очаге воспаления нейтрофилы проявляют слабую фагоцитарную активность. Образование и развитие нейтрофилов у рыб происходит в почке [Ellis, 1977].

Эозинофилы рыб, как и эозинофилы млекопитающих, обычно ассоциируются с повреждениями, вызванными многоклеточными паразитами, особенно гельминтами. Есть данные, что они присутствуют в зоне воспалительной реакции [Гревати, 1991], могут фагоцитировать комплекс антитела с антигеном [Ellis, 1977], принимать участие в иммунном ответе при повторных антигенных стимуляциях [Купер, 1980]. Образуются эозинофилы рыб так же, как и нейтрофилы, в почке, но созревающие формы эозинофилов обнаружены и в селезенке.

#### 2.2.2. Макрофаги

У млекопитающих клетки моноцитоидной линии кроветворения разделяются на моноциты, развивающиеся в костном мозге и затем циркулирующие в крови, и макрофаги — осевшие в тканях моноциты, которые участвуют в иммунном ответе. У рыб так же, как и у высших позвоночных, моноциты образуются в гемопозитических тканях, преимущественно в почке [Ellis, 1977]. В норме в этих органах заканчивается пролиферация клеток, и в кровь выходят уже зрелые, неспособные к дальнейшему делению клетки, которые затем заселяют ткани и начинают выполнять свои функции. Однако методом автордиографии показано, что при воспалительных процессах у взрослых рыб в циркулирующей крови оказываются промоноциты, способные к размножению [Золотова, 1989].

Макрофаги рыб способны к фагоцитозу, они могут напрямую убивать микроорганизмы с помощью активных форм кислорода и азота, а также



продуцировать подобные интерлейкинам млекопитающих вещества, которые усиливают или подавляют иммунные реакции [Verburg-van Kemenade et al., 1994].

На поверхности макрофагов иногда обнаруживаются иммуноглобулины. Вероятно, на плазматической мембране макрофагов существуют рецепторы, посредством которых иммуноглобулины могут быть связаны с клетками [Rombout et al., 1993b; Kousman-van-Diepen et al., 1994b].

### 2.2.3. Неспецифические цитотоксические клетки

В экспериментах *in vitro* показано существование у рыб цитотоксических лейкоцитов, неспецифически лизирующих аллогенные, ксеногенные и инфицированные вирусами аутогенные клетки, а также принимающих активное участие в уничтожении патогенных простейших [Graves et al., 1985; Evans & Jaso-Friedmann, 1992; Nakanishi et al., 1999]. Цитолитический аппарат неспецифических цитотоксических лейкоцитов сходен с таковым у Т-киллеров, то есть они могут убивать клетки-мишени путем контактного лизиса или с помощью различных синтезируемых ими веществ. Кроме того, естественные киллерные клетки, как и Т-хелперы, могут продуцировать цитокины — медиаторы межклеточных взаимодействий при гемопоэзе, иммунных реакциях и межсистемных взаимодействиях. Однако у этих клеток не были обнаружены поверхностные маркеры, характерные для Т-лимфоцитов, и в отличие от других лимфоцитов (и подобно макрофагам), естественные киллерные клетки минуют стадию пролиферации при контакте с мишенью и активации. Имеются сведения, что морфологически и функционально эти клетки схожи с естественными киллерами млекопитающих. Наибольшая активность наблюдается у клеток, выделенных из

пронефроса, хотя эти клетки обнаруживаются и в селезенке, и в периферической крови [Graves et al., 1984].

#### 2.2.4. Лимфоциты

Популяция лимфоцитов у рыб осуществляет функцию адаптивного иммунитета, что характерно и для лимфоцитов млекопитающих. Популяция лимфоцитов рыб гетерогенна, и в ней различают субпопуляции, подобные по поверхностным маркерам и функциям В- и Т-лимфоцитам млекопитающих [Кулинич и Галатюк, 1986; Ellis, 1986; Tate et al., 1990].

*В-лимфоциты*, несущие на своей поверхности распознаваемые с помощью моноклональных антител иммуноглобулины, в онтогенезе рыб обнаруживаются впервые в головной почке и лишь затем — в селезенке и тимусе [Romano et al., 1997a]. В дальнейшем доля этих клеток в почке и селезенке растет, тогда как в тимусе и кишечнике она остается незначительной [Koumans-van-Diepen et al., 1994a; Abelli et al., 1997; Romano et al., 1997a; 1997b]. В головной почке В-лимфоциты равномерно рассредоточены в гемопоэтической ткани и свободны или образуют небольшие кластеры лимфоцитов и плазматических клеток. В селезенке они сконцентрированы в лимфоидных скоплениях или в белой пульпе [Scapigliati et al., 1995].

Большая часть исследований, посвященных *Т-лимфоцитам* рыб и их функциям, основывается на экспериментах *in vitro*, показавших, что у рыб развиваются опосредованные клетками реакции, подобные Т-клеточным реакциям млекопитающих (пролиферация, вызываемая митогенами Т-лимфоцитов; реакция в смешанной культуре лимфоцитов; хелперная активность при синтезе антител,

вызванном тимусзависимыми антигенами; отторжение трансплантата и секреция лимфокинов) [Botham & Manning, 1981; Clem et al., 1985; Miller et al., 1987; Graham & Secombes, 1990; Secombes et al., 1996; Yamamoto et al., 2001]. Однако эти данные лишь косвенно указывают на существование Т-лимфоцитов в иммунной системе рыб. В последние годы с помощью моноклональных антител, специфичных к поверхностным маркерам тимоцитов рыб, было подтверждено, что в иммунной системе рыб существует субпопуляция Т-лимфоцитов, подобных таковым высших позвоночных [Scapigliati et al., 1999a]. Показано, что в этих клетках происходит экспрессия генов, кодирующих Т-клеточный рецептор и гомологичных генам, кодирующим Т-клеточный рецептор у млекопитающих [Partula et al., 1995; Rast et al., 1995; Wilson et al., 1998].

Незрелые Т-лимфоциты на начальных этапах развития зародыша рыбы обнаруживаются преимущественно в тимусе, а также в головной почке, селезенке, кишечнике и крови. По мере развития рыбы число незрелых Т-лимфоцитов снижается, и постепенно они исчезают во всех лимфоидных органах, за исключением тимуса [Romano et al., 1997a; Rombout et al., 1997]. Зрелые Т-лимфоциты, способные выполнять эффекторные функции, обнаруживаются главным образом в слизи и соединительной ткани кишечника [Abelli et al., 1997]. В соответствии с выполняемыми функциями среди Т-лимфоцитов различают субпопуляции Т-хелперов и Т-киллеров, принимающие участие в иммунном ответе соответственно на тимусзависимые и тимуснезависимые антигены [Nakanishi et al., 1999; Stuge et al., 2000].

У рыб обнаружены все основные типы клеток, участвующих в иммунном ответе у высших позвоночных. На рис. 4 представлена схема гемопоэза у млекопитающих, в которой приведены клетки гемопоэтического ряда и показана их связь со стволовой клеткой. У рыб обнаружены те же клеточные элементы и предполагается такая же схема дифференцировки клеток. Это не только опосредующие реакции врожденного иммунитета клетки — гранулоциты, моноциты и макрофаги, неспецифические цитотоксические клетки, — но и лимфоциты, ответственные за реакции антигенраспознающей системы. Среди лимфоцитов рыб различают субпопуляции В- и Т-лимфоцитов, причем последние разделяются на Т-хелперы и Т-киллеры.

## **2.3. Факторы гуморального иммунитета рыб**

### ***2.3.1. Факторы врожденного иммунитета***

У рыб обнаружены многие гуморальные факторы, неспецифически воздействующие на чужеродные агенты и встречающиеся как у эволюционно низших, так и у высших представителей животного мира. Это, в первую очередь, лизоцим, белки системы комплемента, различные цитокины, С-реактивный белок и другие белки и пептиды. Условия среды обитания оказывают значительное влияние на активность факторов неспецифического иммунитета рыб, поэтому эти вещества являются хорошим инструментом для определения токсического воздействия на организм рыб.

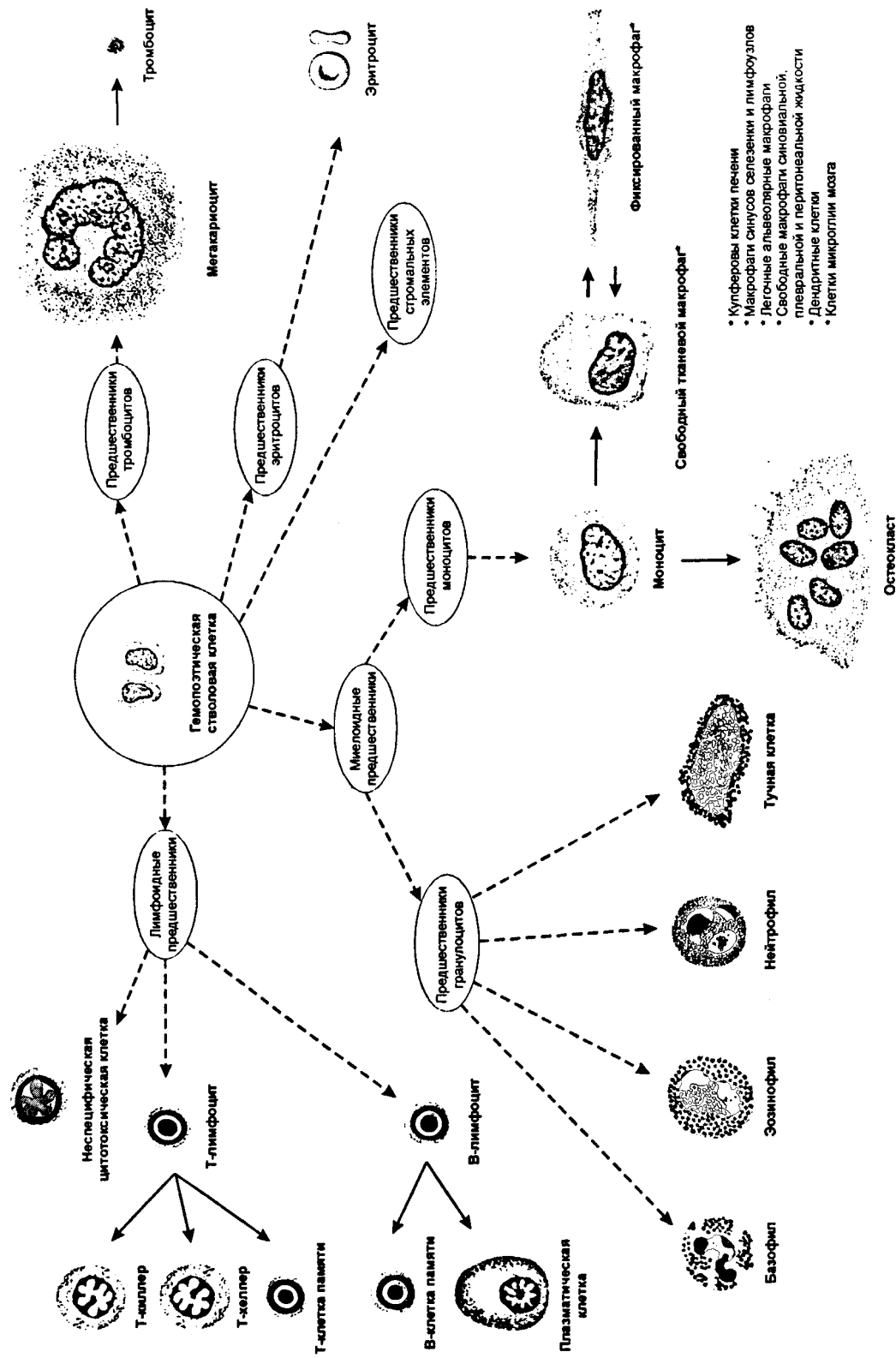


Рис. 4. Схема гемопоэза у высших позвоночных (на примере млекопитающих). Упрощенная схема представляет клеточные линии, происходящие из плюрипотентной гемопоэтической стволовой клетки. Пунктирные стрелки показывают, что между клетками существуют промежуточные типы клеток. Электронограммы клеток увеличены в 1 000 раз. Схема дана по: Stevens, Lowe (1993); Junqueira et al. (1995), с изменениями

*Лизоцим* — универсальный фермент, проявляющий неспецифическое бактерицидное действие, обнаружен у многих представителей животного и растительного мира, и в том числе у рыб. Он гидролизует гликановый компонент пептидогликанового комплекса клеточной стенки бактерий и таким образом ее растворяет, уничтожая непосредственно грамположительные бактерии, а во взаимодействии с белками системы комплемента — даже некоторые грамотрицательные бактерии [Jolles & Jolles, 1984]. Однако лизоцим проявляет и другие свойства, не связанные, как предполагается, с его гликозидазной активностью. В частности, он может подавлять рост грамотрицательных бактерий в отсутствие комплемента, проявляет противовоспалительные свойства, связывая ЛПС и тем самым подавляя его токсические свойства, оказывает опосредованное стимулирующее влияние на фагоцитарную функцию макрофагов и нейтрофилов; кроме того, фермент обладает слабой хитинолитической активностью [Kokoshis & Di Luzio, 1979; Grinde, 1989; Takada et al., 1994]. Лизоцим — один из важнейших компонентов врожденного иммунитета рыб. Он обнаружен в крови, слизи кожи, различных органах и яйцах рыб всех исследованных видов, хотя его активность неодинакова у разных видов рыб [Fletcher & White, 1973; Fonge et al., 1976; Ourth, 1980; Grinde et al., 1988; Grinde, 1989; Lie et al., 1989]. Наибольшая концентрация фермента наблюдается в почке (особенно в головной части), меньше — в селезенке, слизи кожи и кишечника. В сыворотке крови большинства видов рыб лизоцима мало, а в сыворотке некоторых видов рыб он не обнаруживается вовсе. Отмечают сезонные колебания физиологической активности компонентов иммунной системы костистых рыб, в том числе лизоцима сыворотки крови [Hutchinson & Manning, 1996].

Очень древней и широко распространенной системой неспецифических гуморальных факторов защиты животных является *система комплемента*. Многие ее компоненты обнаружены у беспозвоночных. У рыб найдены и выделены белки, гомологичные белкам системы комплемента млекопитающих и приводящие к неспецифическому фагоцитозу или лизису клеток-мишеней [Nonaka et al., 1981a; 1981b; Nakao & Yano, 1998; Sunyer et al., 1998]. Это, в частности, белки C1, C2, C3 и C4 и мембраноатакующий комплекс. Однако система комплемента рыб структурно и функционально более разнообразна, чем система комплемента млекопитающих. Например, у костистых рыб присутствуют множественные функционально различные формы белка C3, которые с разной специфичностью связываются с поверхностями, активирующими комплемент [Sunyer et al., 1997; Nakao & Yano, 1998]. Возможно, что в дальнейшем эволюционном развитии позвоночные утратили это многообразие системы комплемента, тогда как у рыб оно позволяет в некоторой степени компенсировать несовершенство приобретенного иммунитета. Кроме того, в отличие от системы комплемента млекопитающих, система комплемента рыб может быть активирована при очень низких температурах [Sunyer et al., 1998]. Эти особенности позволяют иммунной системе рыб быстро реагировать на внешнее воздействие, особенно тогда, когда активность антигенраспознающей системы снижена. Как и у млекопитающих, активация комплемента у костистых рыб может идти по двум путям — альтернативному и классическому, причем активность альтернативного пути активации комплемента у рыб в несколько раз выше, чем у высших позвоночных [Sunyer & Tort, 1995]. Эти данные соответствуют представлению, что альтернативный путь активации комплемента, для инициации каскадных реакций которого необходима активированная форма компонента C3,

эволюционно древнее, чем классический путь активации, для которого требуется наличие иммунных комплексов антигена с антителом. У более низко организованных круглоротых, несмотря на наличие белков, относящихся к системе комплемента, таких как C3, C4 и C5, обнаружен только альтернативный путь активации системы комплемента [Ishiguro et al., 1992; Nonaka et al., 1984].

У рыб найдены белки и гликопротеины, схожие по строению и функциям с *цитокинами* млекопитающих. Цитокины синтезируются активированными клетками иммунной системы и обуславливают короткодистантное межклеточное взаимодействие при иммунных и других реакциях. При культивировании лейкоцитов и сенсibilизированных или трансформированных лимфоцитов рыб из культуральной жидкости были выделены белки, структурно и функционально схожие с интерлейкином-1 млекопитающих [Verburg-van Kemenade et al., 1995], интерлейкином-2 [Caspi & Avtalion, 1984], фактором активации макрофагов [Francis & Ellis, 1994], интерферонами  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  [Alexander & Ingram, 1992]. В последние несколько лет у рыб были обнаружены гены, высоко гомологичные генам цитокинов млекопитающих, такие как трансформирующий фактор роста бета [Hardie et al., 1998], интерлейкин-1 $\beta$  [Secombes et al., 1997] и некоторые хемокины [Dixon et al., 1997], что подтверждает, с одной стороны, присутствие в иммунной системе рыб факторов, сближающих ее с иммунной системой наземных позвоночных, а с другой — дает надежду обнаружить у рыб и уникальные, не известные у высших позвоночных белки [Secombes et al., 1999].

*C-реактивный белок* рыб, гомологичный *C-реактивному белку* млекопитающих, обладает высоким сродством к фосфорилхолину (компоненту



полисахаридов многих бактериальных клеток, грибов), нуклеиновым кислотам, гистонам. Способен увеличивать подвижность лейкоцитов, взаимодействовать с комплементом, принимать участие в лизисе содержащих эти вещества клеток-мишеней [Murai et al., 1990; Szalai et al., 1992]. В норме концентрация С-реактивного белка в сыворотке крови рыб невысока, но при остroteкущих инфекциях, сопровождающихся сильными воспалительными процессами, его концентрация резко возрастает, и затем динамика концентрации белка в сыворотке соответствует ходу воспаления.

К врожденной составляющей иммунной системы рыб относятся и многие другие белки, такие как лектины, агглютинины, естественные антитела сыворотки крови рыб [Балахнин, 1986; Logtenberg, 1990; Lund & Olafsen, 1998; Fock et al., 2001]. *Трансферрин* — белок, переносящий железо из кишечника и мест разрушения гемоглобина в печень. Связывая железо, трансферрин делает его недоступным для микроорганизмов, тем самым проявляя бактериостатическое действие и защищая рыб от инфекции [Roed et al., 1995; Sealey et al., 1997]. *Хитиназа* — фермент, присутствующий во многих лимфоидных тканях рыб и не обнаруженный только в тимусе. Фермент разрушает хитин и предохраняет рыб от грибов и многих паразитических беспозвоночных [Fonge et al., 1976]. Сыворотка рыб содержит *ингибиторы протеаза*, которые нейтрализуют и контролируют протеолиз клеток и тканей рыб внеклеточными ферментами, синтезируемыми патогенными бактериями, например *Aeromonas salmonicida* и *Aeromonas hydrophila*, а также многими грибами. К таким факторам относится  $\alpha_2$ -макроглобулин и

$\alpha_1$ -антитрипсин [Starkey & Barrett, 1982; Hjelmeland, 1983; Ellis, 1987; Rockey et al., 1989; Bowden et al., 1997].

В последнее десятилетие все больший интерес исследователей привлекают *антимикробные пептиды* — низкомолекулярные (4–5 кДа) соединения, которые встречаются практически у всех представителей животного и растительного мира и обладают способностью неспецифически взаимодействовать с клеточной мембраной бактериальной клетки и нарушать ее целостность, тем самым препятствуя жизнедеятельности бактерий. Антимикробные пептиды могут, кроме того, проявлять противовирусную и антигрибковую активность, а иногда ингибировать рост и размножение простейших [Кокряков, 1999; Lehrer & Ganz, 1996]. Антимикробные пептиды обнаружены и у рыб [Park et al., 1998; Douglas et al., 2001].

### **2.3.2. Факторы приобретенного иммунитета**

Как у высших позвоночных, гуморальными факторами приобретенного иммунитета рыб (специфическими гуморальными факторами иммунной системы) являются антитела. Антитела костистых рыб представляют собой белки, по аминокислотной последовательности, вторичной и третичной структуре гомологичные иммуноглобулинам класса М (IgM) млекопитающих. Это тетрамеры (в отличие от IgM млекопитающих, которые являются пентамерами) с молекулярной массой около 800 кДа, каждая субъединица которых состоит из двух пар легких и тяжелых цепей [Shelton & Smith, 1970; Marchalonis, 1971; Marchalonis et al., 1992; Smith et al., 1993]. На рис. 5 представлена структура мономерной субъединицы IgM лосося (А) и трески (Б).

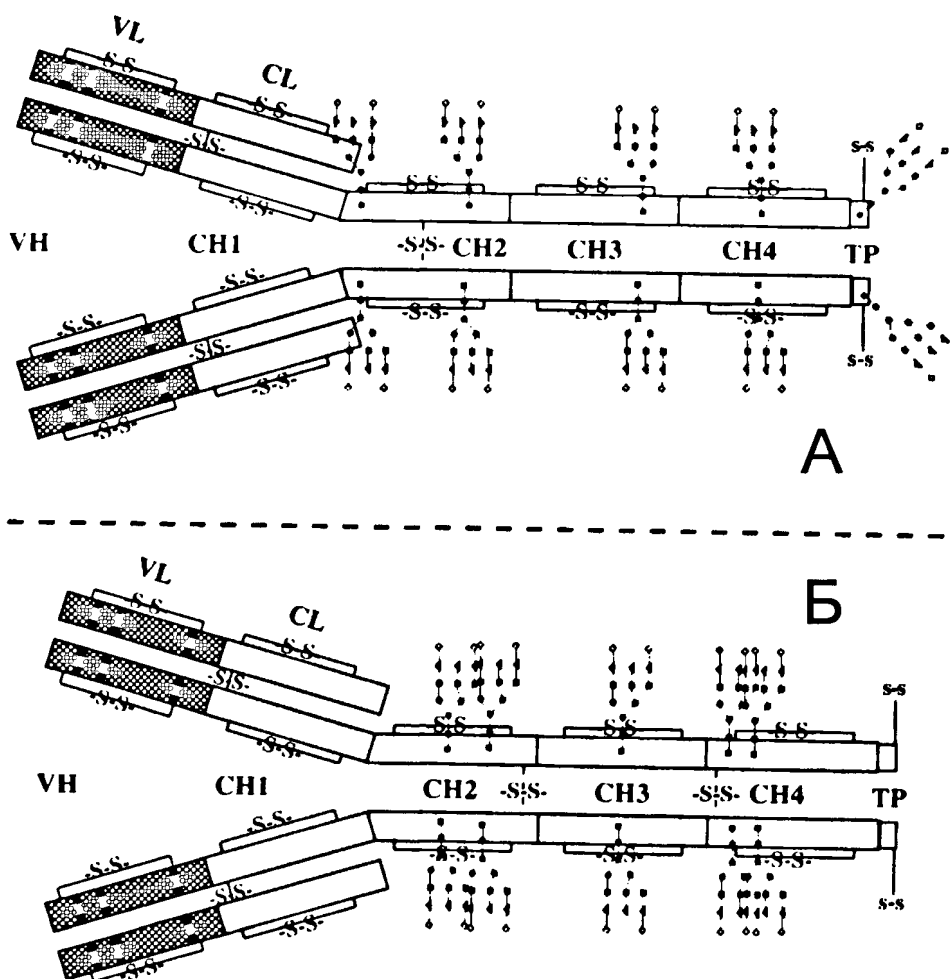


Рис. 5. Схема мономера IgM рыб: А — из лосося, Б — из трески. Мономерная единица состоит из двух легких цепей (L) и двух тяжелых цепей (H), связанных соединительной цепью или межцепочечными дисульфидными мостиками (S-S). Цепи состоят из переменных (V) и константных (C) доменов, соединенных внутрицепочечными дисульфидными мостиками, и хвостового отрезка (TP). На схеме указаны предположительные сайты гликозилирования иммуноглобулинов. Схема дана по: Bengten et al. (1999); Hordvik et al. (1992)

Тяжелые цепи имеют молекулярную массу 72–77 кДа. Расположение и состав углеводных остатков, ковалентно связанных с тяжелой цепью иммуноглобулинов рыб, соответствует расположению и составу таковых  $\mu$ -цепей иммуноглобулинов млекопитающих. Хотя до сих пор принято относить тяжелые цепи иммуноглобулинов рыб к одному классу, некоторые авторы [Kobayashi & Tomonaga, 1988; Lobb & Olson, 1988] сообщают о гетерогенности популяции тяжелых цепей иммуноглобулинов рыб как по молекулярной массе, так и по антигенным детерминантам, которую нельзя отнести на счет аллотипических вариаций.

У некоторых групп рыб обнаружены гены, кодирующие тяжелые цепи иммуноглобулинов других типов, но экспрессия этих генов не всегда выявлена. Функции таких иммуноглобулинов также пока неизвестны. У костистых рыб вида *Ictalurus punctatus* выделен ген, гомологичный гену, кодирующему тяжелую цепь IgG млекопитающих, экспрессия которого происходит одновременно с экспрессией гена, кодирующего тяжелую цепь IgM [Wilson et al., 1997]. Однако неизвестно, ассоциированы ли эти тяжелые цепи с легкими и формируют ли они классическую структуру иммуноглобулина. У акул, находящихся на начальных этапах онтогенеза, показана экспрессия генов, кодирующих тяжелые цепи, гомологичные по аминокислотной последовательности тяжелым цепям IgM, но имеющие три, а не четыре константных домена [Rumfelt et al., 2001].

Легкие цепи имеют молекулярную массу 22–26 кДа и делятся на два класса, различающихся первичным строением полипептидной цепи [Lobb et al., 1984; Sanchez & Dominguez, 1991; Sanchez et al., 1995; Belov et al., 2001]. Легкие цепи соединены с тяжелыми цепями дисульфидными связями.

Субъединицы, составляющие тетрамер, могут быть связаны между собой ковалентно, через дисульфидные мостики между остатками цистеина в С-концевых районах тяжелых цепей (кстати, не имеющими гомологов в  $\mu$ -цепях иммуноглобулинов млекопитающих), или нековалентно [Lobb & Clem, 1981a; Kobayashi et al., 1982; Lobb & Olson, 1988; Sanchez & Dominguez, 1991]. В иммуноглобулинах некоторых видов рыб обнаружена соединительная J-цепь, также нековалентно связанная с тетрамером [Kobayashi et al., 1982; Buchmann et al., 1992].

В слюне и желчи рыб присутствуют антитела, с которыми ковалентно связан белок, отсутствующий в антителах сыворотки крови, — возможно, секреторный компонент [Lobb & Clem, 1981a; 1981b]. Клетки, продуцирующие такие антитела, присутствуют преимущественно в кишечнике, тогда как в головной почке, селезенке и крови их мало [Rombout et al., 1993a]. Эти данные подтверждают наличие у рыб двух форм иммунного ответа — мукозального и сывороточного, опосредуемых различными популяциями лимфоцитов.

Антитела, выделенные у разных видов костистых рыб, обладают неодинаковыми биохимическими и физиологическими свойствами, например различной чувствительностью к протеолитическому расщеплению [van Ginkel et al., 1991; Glynn & Pulsford, 1993; Magnadottir, 1998] и различной степенью гликозилирования [Acton et al., 1971; 1972; Magnadottir, 1998].

Имуноглобулины различной специфичности у костистых рыб продуцируются различными клонами В-лимфоцитов, что подтверждается обнаруженной у рыб гетерогенностью В-лимфоцитов [Miller et al., 1987; Lobb & Olsen, 1988; Koumans-van Diepen et al., 1995]. Различные изотипические формы IgM

и гибкость их структуры у рыб могут, вероятно, являться прообразом разнообразия классов иммуноглобулинов, наблюдаемого у высших позвоночных.

Концентрация иммуноглобулинов в крови здоровых рыб подвержена изменениям. В основном, эти различия связаны с возрастом, размером рыб, временем года, концентрацией кислорода в воде. Так, показано, что с повышением концентрации кислорода уровень антител в сыворотке крови растет. По мере роста и взросления рыбы увеличивается их концентрация в сыворотке крови [Sanchez et al., 1993; Estevez et al., 1995; Scapigliati et al., 1999b] и растет количество клеток, секретирующих антитела [Dos Santos et al., 2001a].

У многих видов костистых рыб было обнаружено явление переноса специфических антител от иммунизированной самки рыб к оплодотворенным яйцеклеткам [Mor & Avtalion, 1990; Rombout et al., 1993b]. Однако до сих пор неясно, способствуют ли эти антитела защите личинок рыб от инфекций [Sin et al., 1994; Lillehaug et al., 1996]. Ко времени проклевывания личинки в ней истощается популяция материнских иммуноглобулинов и начинается синтез собственных [Scapigliati et al., 1999a].

Таким образом, иммунитет рыб представлен, с одной стороны, многочисленными неспецифическими гуморальными факторами и фагоцитирующими клетками, которые характерны для самых разнообразных представителей животных и растений и поддерживают биологическую индивидуальность этих организмов. С другой стороны, у рыб обнаружены клетки и гуморальные факторы, обеспечивающие у наземных позвоночных функционирование адаптивного иммунитета. Такая клеточная и молекулярная

разноплановость организации иммунной системы рыб дает ей возможность развивать все формы иммунного ответа, характерные для высших позвоночных животных.

## **2.4. Развитие иммунного ответа**

Иммунный ответ представляет собой комплекс реакций, направленных на распознавание «чужого», удаление его и запоминание [Ярилин, 1999]. Среда обитания определяет особенности иммунитета водных животных.

Для водной среды характерны значительные колебания физических и химических параметров. Кроме того, в водной среде быстрее распространяются биологические макромолекулы, представляющие наибольшую биологическую опасность, тогда как воздушная среда является для них хорошим барьером. Возможно, именно поэтому, несмотря на принципиальное сходство иммунных систем рыб и высших позвоночных, система рыб более лабильна и в ней интенсивнее функционируют врожденные механизмы, обеспечивающие немедленное реагирование на внешнее воздействие.

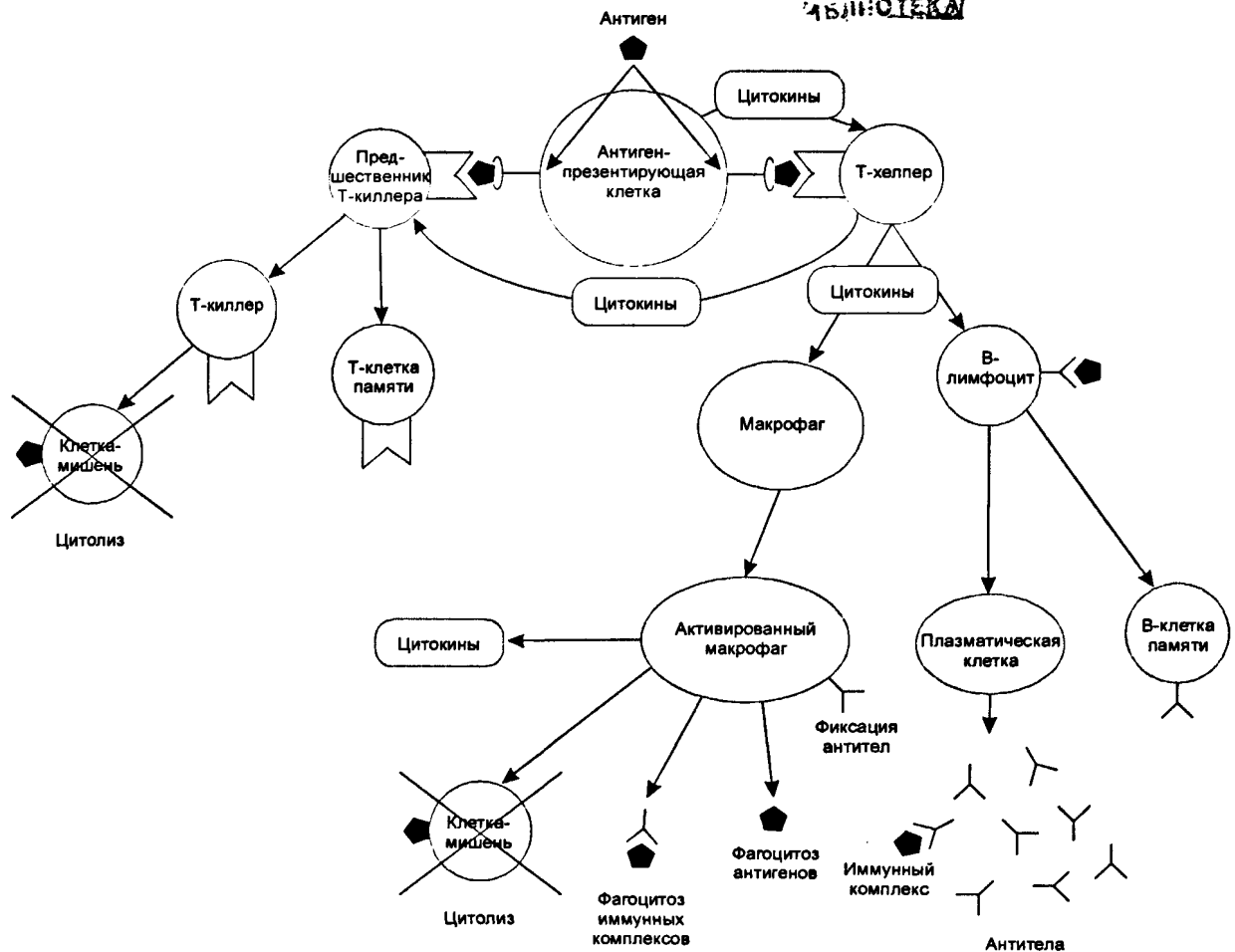
### ***2.4.1. Первичный и вторичный иммунный ответ, формирование специфической памяти***

При попадании чужеродного антигена в организм рыбы в первую очередь активируются *неспецифические* механизмы иммунитета. Уже в течение первых часов после инвазии в периферической крови и почке увеличивается количество участвующих в иммунном ответе неспецифических клеток — нейтрофилов, моноцитов и макрофагов, повышается их фагоцитарная активность [Hoeglund &

Thuvander, 1990; Waterstrat et al., 1991; Hoeglund et al., 1992; Sharp et al., 1992]. В крови растёт концентрация гуморальных факторов неспецифической защиты — лизоцима [Kondratieva et al., 1995], белков системы комплемента [Brubacher et al., 2000], естественных антител и пропердина, стимулируется синтез С-реактивного белка [Kodama et al., 1989]. Начинается активная секреция цитокинов [Jorgensen et al., 2001] — интерлейкина-1 [Verburg-van Kemenade et al., 1995], фактора активации макрофагов [Francis & Ellis, 1994], интерлейкина-2 [Caspi & Avtalion, 1984].

Помимо неспецифических механизмов иммунитета рыбы развивают *адаптивные*, специфические механизмы. Предположительная схема действия иммунных механизмов рыб схожа со схемой иммунного ответа у млекопитающих (рис. 6), однако некоторые звенья этих взаимодействий у рыб до сих пор не изучены. Макрофаги поглощают чужеродный антиген, обрабатывают его и затем доставляют в головную часть почки, селезенку и другие органы для презентации клеткам иммунной системы [Avtalion & Shahrabani, 1975; Estepa et al., 1992; Vallejo et al., 1992]. Помимо этого активированные макрофаги синтезируют интерлейкин-1, фактор некроза опухоли, трансформирующий фактор роста и другие медиаторы, регулирующие деятельность лимфоцитов [Brubacher et al., 2000; Laing et al., 2001]. Т-лимфоциты созревают под действием медиаторов и после этого могут либо уничтожать чужеродный агент, либо активировать В-лимфоциты посредством медиаторов или прямых клеточных контактов [Компанеев и др., 1990; Miller et al., 1985]. В результате взаимодействия антигена с Т- и В-лимфоцитами последние





**Рис. 6.** Развитие иммунного ответа у млекопитающих. Антигенпрезентирующие клетки (макрофаги, дендритные клетки, В-лимфоциты) обрабатывают антиген и представляют его Т-лимфоцитам; В-лимфоциты способны связывать свободный антиген. Активированные вследствие контакта клеток и действия цитокинов лимфоциты пролиферируют и дифференцируются в эффекторные клетки. Т-киллеры разрушают клетки, несущие на поверхности антиген. Т-хелперы секретируют цитокины, которые активируют макрофаги и способствуют дифференцировке В-лимфоцитов в плазматические клетки. Активированные макрофаги уничтожают антигены и клетки, несущие на поверхности антигены, а также секретируют цитокины. Плазматические клетки продуцируют антитела, которые связывают свободные и связанные с мембранами антигены, способствуя тем самым их разрушению. Часть активированных Т- и В-лимфоцитов образуют Т- и В-клетки памяти. Схема дана по: Ярилин (1999); Kuby (1992), с изменениями

трансформируются в плазматические клетки и начинают продуцировать специфичные для антигена антитела. Существуют косвенные данные, что часть В-лимфоцитов образует клетки памяти [Miller et al., 1985; Hoeglund et al., 1992; Houghton et al., 1992; Magnadottir & Gudmundsdottir, 1992; Sharp et al., 1992; Vinitnantharat & Plumb, 1993].

У высших позвоночных формирование клеток памяти является основой для более сильного вторичного иммунного ответа, развивающегося в том случае, если организму придется вновь контактировать с этим антигеном. Данные, полученные при изучении рыб, противоречивы и требуют уточнения. Показано, что при экспериментальной вирусной инфекции у рыб пик вторичной опосредованной клетками специфической цитотоксичности достигается быстрее (на 7–10-е сутки), чем при первом контакте с антигеном [Somamoto et al., 2000]. При вторичной бактериальной инфекции титр специфических антител выше и максимум их синтеза достигается на несколько недель раньше по сравнению с первичной инфекцией [Vinitnantharat & Plumb, 1992; Ristow et al., 1993; dos Santos et al., 2001b; Steine et al., 2001]. Однако другие авторы сообщают об отсутствии выраженного вторичного иммунного ответа и иммунологической памяти у рыб [Lamers et al., 1985]. Есть данные об отсутствии синтеза специфических антител при иммунном ответе у рыб [Magnadottir et al., 2001]. Видимо, причиной этих противоречий является то обстоятельство, что представленные данные получены на разных группах рыб. Кроме того, причиной может быть различие в способе иммунизации рыб.

#### 2.4.2. Трансплантационные реакции

Механизмы приживления или отторжения трансплантата у рыб в значительной степени соответствуют таковым у более высокоорганизованных позвоночных [Балахнин и Неборачин, 1991; Botham & Manning, 1981; Ristow et al., 1996]. Ауто трансплантаты приживаются хорошо и быстро, нарушенные ткани при этом полностью регенерируют. Алло трансплантаты вначале ведут себя так же, как и ауто трансплантаты: происходит частичное восстановление кровеносных сосудов, однако затем алло трансплантаты погибают. Ксено трансплантаты разрушаются быстро и полностью. Как и у млекопитающих, отторжение чужеродного участка сопровождается увеличением концентрации иммунных клеток хозяина, многочисленными кровоизлияниями в капиллярах, повышением температуры в зоне, прилегающей к ткани реципиента [Nakanishi et al., 1999].

Время выживания пересаженной ткани различно, вплоть до нескольких месяцев у двоякодышащих рыб [Haas, 1982]. Однако динамика первичных и вторичных пересадок различна: так, время выживания чешуи, пересаженной вторично от того же донора, в 1,5–2 раза меньше. Дальнейшие пересадки по скорости отторжения трансплантата не отличаются от вторичных. Такие наблюдения косвенно указывают на формирование у рыб иммунологической памяти по отношению к трансплантату.

Основой распознавания своих и чужеродных тканей у рыб, как и у теплокровных животных, служат белки, кодируемые генами главного комплекса гистосовместимости (МНС), причем для отторжения аллогенного участка необходимы различия по обоим гаплотипам диплоидного набора аллельных генов

[Фонталин, 1988; Nakanishi et al., 1999]. Функциональные и молекулярные исследования показали наличие у рыб генов, кодирующих антигены МНС I и II классов, и соответствующих белков [Flajnik et al., 1999]. У карпа идентифицированы гены, кодирующие белки, гомологичные тяжелой цепи молекулы МНС I класса млекопитающих и  $\beta$ -цепи молекулы МНС II класса млекопитающих [Hashimoto et al., 1990]; у акул выделены гены, кодирующие белки, гомологичные  $\alpha$ -цепи молекулы МНС II класса млекопитающих [Kasahara et al., 1992]. При пересадке трансплантата реципиенту с более гомологичными антигенами гистосовместимости увеличивается время выживания пересаженного участка. На базе различий во времени отторжения чужеродного трансплантата были сделаны попытки классифицировать рыб по совместимости тканей [Добринская, 1973]. Но такая классификация возможна только в пределах вида (внутрипопуляционная и межпопуляционная дифференциация), так как изменчивость комплекса трансплантационных антигенов в пределах разных популяций может перекрывать межвидовые различия по тканевой совместимости.

В реакциях отторжения у рыб принимают участие главным образом цитотоксические Т-лимфоциты, что характерно и для млекопитающих [Abelli et al., 1999; Nakanishi & Ototake, 1999].

#### ***2.4.3. Реакции гиперчувствительности***

У рыб, как и у высших позвоночных, развиваются реакции гиперчувствительности. У рыб обнаружена анафилаксия, выражающаяся в учащении дыхания, изменении окраски тела, потере равновесия, однако степень выраженности этих реакций гораздо меньше, чем у позвоночных. Для многих видов

рыб была показана гиперчувствительность замедленного типа, опосредованная Т-лимфоцитами [Nakanishi et al., 1999].

#### *2.4.4. Противоопухолевая активность*

Неспецифические цитотоксические лейкоциты периферической крови рыб способны спонтанно и без явного периода индукции убивать собственные трансформированные клетки, что было показано экспериментально [Moody et al., 1985; Cadwell et al., 1990; Dustin et al., 1990; Houghton & Matthews, 1990; Morita & Sano, 1990; Islam & Woo, 1991]. Выделены и клонированы гены, которые кодируют пептиды, участвующие в противоопухолевой активности у рыб [Macouzet et al., 1999].

### **2.5. Регуляция иммунной системы**

Иммунная система рыб, как и высших позвоночных, осуществляет саморегуляцию с помощью, во-первых, непосредственных контактов клеток (макрофагов, нейтрофилов и цитотоксических Т-лимфоцитов) [Avtalion & Shahrabani, 1975; Estepa et al., 1992] и, во-вторых, гуморальных факторов (цитокинов) [Secombes et al., 1999].

На уровне организма иммунитет рыб и млекопитающих контролирует нейроэндокринная система. Действие кортикостероидных гормонов сказывается, прежде всего, во время стрессов, причины которых могут быть различны. В рыбоводстве, например, это в первую очередь отлов рыб, сортировка, транспортировка, а также изменение качества воды, в которой содержатся рыбы. Действие кортикостероидных гормонов выражается в общей иммуносупрессии

[Espelid et al., 1996]: подавляется активность макрофагов и лимфоцитов, комплемента, снижается концентрация лизоцима и уменьшается синтез антител [Исаева и Козиненко, 1992; Киташова и др., 1997; Stave & Roberson, 1985; Houghton & Matthews, 1990; Tatner, 1990; Kondratieva et al., 1995; Law et al., 2001; Ortuno et al., 2001b]. Кроме того, колебания иммунореактивности у рыб отмечены при половом созревании, когда повышается уровень тестостерона в крови [Schreck et al., 1991], а также при сезонных изменениях концентрации кортизола в крови рыб [Steine et al., 2001]. Одновременно с этим происходят изменения в количестве глюкокортикоидных рецепторов на поверхности лимфоцитов и лейкоцитов и в их аффинности к кортизолу [Maule et al., 1993].

Не меньшую роль в регулировании иммунореактивности рыб играют природные условия, загрязнение среды обитания, а при искусственном разведении рыб — различные кормовые добавки и лекарственные препараты.

Сильное воздействие на иммунитет рыб оказывает *температура* среды обитания. Температура воды не только регулирует физиологическое состояние патогенных микроорганизмов и их количество, но и влияет на восприимчивость рыб к возбудителю, длительность инкубационного периода, выраженность заболевания и его исход. Существуют многочисленные данные о влиянии температуры на иммунитет рыб [Балахнин, 1992; Сильченко и Попов, 1992; Киташова и др., 1997; Bower & Evelyn, 1988; Bly & Clem, 1991; 1992; Sheldon & Blazer, 1991; Vinitnantharat & Plumb, 1993; Steine et al., 2001]. Для каждого вида и даже для каждой популяции рыб существует температурный интервал, при котором соотношение свободных клеточных элементов крови, активность фагоцитирующих

клеток и лимфоцитов, титр агглютининов крови и продукция антител оптимальны. Любое изменение температуры, выходящее за пределы этого интервала, приводит к вспышке заболеваний, причем для арктических рыб опасно повышение температуры, а для тропических — понижение. Примером может служить наблюдаемая в природе сезонность определенных болезней, таких как болезнь «красного рта», вызываемая у форели грамотрицательным микроорганизмом *Yersinia ruckeri* [Stevenson, 1997].

Показано, что к факторам, регулирующим иммунитет рыб, также относится жесткость воды, ее кислотность, содержание в воде кислорода, соленость. Повышенная концентрация ионов кальция и магния в воде стимулирует сопротивляемость рыб возбудителям, оптимумом рН для рыб является интервал от 5 до 10, снижение концентрации кислорода ниже 4 мг/л приводит к развитию иммунодефицита, в том числе к снижению активности комплемента и лизоцима [Hajji et al., 1989]. Соленость воды оказывает особенно заметное влияние на проходных рыб. Так, увеличение солености стимулирует возрастание концентрации лизоцима в сыворотке крови радужной форели, хотя и не оказывает влияния на уровень иммуноглобулинов в крови [Yada et al., 2001].

Оказывать влияние на состояние иммунной системы рыб может ультрафиолетовое излучение. В экспериментах *in vitro* под действием ультрафиолетовых лучей изменяется формула крови рыб, изменяются параметры основных лимфатических органов. На некоторое время падает активность кислородного взрыва и естественная цитотоксическая активность гранулоцитов

головной почки, а также стимулированная митогенами пролиферация лимфоцитов селезенки [Jokinen et al., 2000; 2001].

В настоящее время все большее значение в регуляции иммунной системы рыб приобретают техногенные воздействия на среду обитания, вызывающие чаще всего подавление и врожденных, и приобретенных механизмов иммунитета. Это проявляется как у промысловых рыб, так и при промышленном разведении рыб.

Обнаружено, что иммунная система рыб чувствительна к *пестицидам*, в частности к малатиону и линдану, вызывающим снижение количества иммунокомпетентных клеток в головной почке и селезенке и снижение титра агглютининов в сыворотке крови, а также увеличение концентрации в ней кортизола [Plumb & Areechon, 1990; Hart et al., 1997]. *Инсектициды*, такие как трихлорфон, вызывают снижение числа малых лимфоцитов, ослабление фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов и уменьшение уровня лизоцима в крови [Cossarini-Dunier et al., 1990; Siwicki et al., 1990; Holladay et al., 1996].

*Ароматические углеводы* (нефтепродукты и производственные отходы) подавляют фагоцитарную активность макрофагов почек [Seeley & Weeks-Perkins, 1991], вызывают дегенеративные изменения ядра и цитоплазмы гранулоцитов [Sonzogni et al., 1991], снижение титра антител в сыворотке крови [Bucke et al., 1989] и подавляют пролиферацию лимфоцитов [Faisal & Huggett, 1993]. Показано, что полициклические ароматические углеводы могут продуцировать злокачественные новообразования у рыб [Baumann, 1998].



Наблюдали токсическое действие на иммунную систему рыб хлорсодержащих стоков промышленных предприятий, в частности деревообрабатывающих и целлюлозно-бумажных комбинатов: в крови и селезенке снижается уровень клеток, синтезирующих антитела, уменьшается концентрация антител в крови. Подавляется и неспецифический иммунитет: в опытах *in vitro* показано снижение миграции нейтрофилов и выраженности кислородного взрыва нейтрофилов головной почки [Aaltonen et al., 2000]. Используемые при окраске морских судов хлорсодержащие вещества, являющиеся привычным поллютантом гаваней, подавляют продукцию активных форм кислорода в организме рыб [Regala et al., 2001]. В результате загрязнения вод хлорсодержащими соединениями в рыбах могут развиваться опухоли [Grizzle et al., 1981].

Оловоорганические соединения, широко распространенные в промышленности и сельском хозяйстве, также загрязняют окружающую среду, в том числе и воды. Особенно высока концентрация этих соединений в водах портов и гаваней. Показано, что в организме рыб оловоорганические соединения даже в низких концентрациях существенно подавляют пролиферацию клеток селезенки и почки [O'Halloran et al., 1998], продукцию антител и активных форм кислорода [Regala et al., 2001]. Кроме того, рыбы способны биоаккумулировать эти соединения [Tsuda et al., 1988], причем их концентрация в селезенке и почке рыб может в несколько тысяч раз превышать концентрацию в окружающей воде [Schwaiger et al., 1992], что становится опасным явлением уже для человека, использующего такую рыбу в пищу.

Рыбы гораздо чувствительнее, чем высшие позвоночные, к *тяжелым металлам*. Превышающая норму концентрация в воде ионов цинка, ртути, кадмия, меди приводит к уменьшению титра антител в крови, концентрации лимфоцитов, подавлению фагоцитарной активности клеток [Anderson & Dixon, 1989; Dethloff et al., 2001]. С другой стороны, небольшие концентрации этих ионов могут не вызывать настолько тяжелых последствий [Thuvander, 1989] и даже стимулировать некоторые реакции иммунитета [Балахнин и Лукьяненко, 1991; Исаева и Козиненко, 1992].

*Нитраты*, по некоторым данным [Исаева и Козиненко, 1992], тоже снижают степень устойчивости рыб к возбудителям заболеваний.

На организм рыб иммуномодулирующее действие могут оказывать другие экзогенные факторы [Sakai, 1999]. В первую очередь к ним относятся вещества, получаемые рыбами с кормом при искусственном разведении. Установлена непосредственная связь между составом корма и иммунным ответом у рыб [Landolt, 1989; Blazer, 1992; Sakai, 1999].

Рыбам для поддержания нормального иммунологического статуса и индукции неспецифической резистентности к инфекции необходимы, по меньшей мере, одиннадцать водорастворимых и четыре жирорастворимых *витамина*. Например, сопротивляемость бактериальной инфекции напрямую зависит от концентрации витамина С в корме [Navarre & Halver, 1989; Erdal et al., 1991; Hardie et al., 1991; Roberts et al., 1995; Ortuno et al., 2001a]. Недостаток витамина Е, равно как и таких антиоксидантов, как n-3 жирные кислоты, выражается в снижении активности фагоцитов головной части почек [Obach & Laurencin, 1992] и кишечника

[Clerton et al., 2001], повышенной хрупкости эритроцитов, снижению активности лизоцима и комплемента плазмы [Sheldon & Blazer, 1991; Obach et al., 1993] и, в конце концов, к повышенной смертности рыб от инфекции [Hardie et al., 1990]. К подобным результатам приводит и недостаток пантотеновой кислоты в корме рыб [Thomas & Woo, 1990]. Исследователи обнаружили синергетическое стимулирующее воздействие витаминов С и Е на выраженность кислородного взрыва у фагоцитов рыб [Ortuno et al., 2001a].

Для нормальной сопротивляемости рыб возбудителям заболеваний им необходим и сбалансированный *аминокислотный* состав пищи. Так, недостаточность в пище аргинина приводит к снижению продукции макрофагами оксида азота (II), необходимого для эффективного уничтожения микроорганизмов [Buentello & Gatlin, 1999]. Глутамин также необходим для нормальной работы иммунной системы рыб [Wilson & Fowlkes, 1976; Buentello & Gatlin, 1999].

При исследовании влияния *лекарственных препаратов* на иммунные реакции у рыб обнаружено, что, помимо терапевтического действия, некоторые лекарства могут влиять на иммунитет. Например, при использовании тетрациклина, окситетрациклина, триамцинолина или циклофосфамида у рыб наблюдаются такие реакции, как подавление активности фагоцитирующих макрофагов, уменьшение числа лимфоцитов и циркулирующих лейкоцитов, подавление продукции антител [Tatner, 1990; Angelidis et al., 1991; Kitao et al., 1991; Lunden et al., 1998]. Напротив, антигельминтный препарат левамизол выступает как стимулятор и неспецифического, и специфического иммунитета. Он вызывает активацию фагоцитов, нейтрофилов, неспецифических цитотоксических клеток, приводит к

повышению уровня лизоцима, комплемента и антител в сыворотке крови рыб [Siwicki, 1989; Kajita et al., 1990; Anderson & Jeney, 1992]. Используемые для лечения энтерита рыб антибактериальные средства нифулин и биовит повышают концентрацию лизоцима в сыворотке крови, тогда как кормогризин и бацилихин — подавляют [Наумова и др., 1997; Kondratieva et al., 1994]. Некоторые препараты могут оказывать двойное — стимулирующее и подавляющее — действие на иммунную систему рыб: оксолиновая кислота может не только вызывать снижение продукции антител и уровня циркулирующих лейкоцитов, но и стимулировать фагоцитирующую активность лейкоцитов крови [Lunden et al., 1998].

Иммуномодулирующее действие оказывают некоторые углеводы. Полисахариды глюкан, лентинан, шизофиллан и склероглюкан, выделяемые из клеточных стенок грибов, бактерий и лишайников, активируют у рыб альтернативный путь активации комплемента, усиливают действие лизоцима, макрофагов [Niki et al., 1991; Yano et al., 1991; Jorgensen et al., 1993; Baunly et al., 1996; Paulsen et al., 2000], а липополисахарид — компонент клеточных стенок грамотрицательных бактерий — активирует фагоцитарную активность лейкоцитов и макрофагов, увеличивает их плотность, размер гранулоцитов, является митогеном для лимфоцитов, усиливает действие С-реактивного белка, стимулирует продукцию цитокинов и лизоцима [Clem et al., 1985; Al-Harbi & Austin, 1992; Neumann et al., 1995; Paulsen et al., 2000]. Хитин, являющийся основным компонентом экзоскелета ракообразных и насекомых и клеточной стенки грибов, повышает сопротивляемость рыб инфекциям [Sakai et al., 1992; Siwicki et al., 1994].

Исследователи отмечали, что попадающие в организм вместе с кормом *микотоксины* вызывают снижение концентрации гемоглобина в крови и числа эритроцитов. В ряде случаев наблюдается ингибирование биосинтеза белка и некроз жабр отравленных рыб [Исаева и Козиненко, 1992].

Таким образом, экзогенные факторы, регулирующие деятельность иммунной системы рыб, необходимо учитывать при разведении рыб в прудовых хозяйствах. С помощью кормовых добавок можно не только снизить риск развития дисфункции иммунитета, но и восстановить и даже повысить иммунореактивность. Иммуностимуляторы могут усилить иммуногенность вакцин.

\* \* \*

Организация иммунной системы большинства рыб уже во многом превосходит организацию иммунной системы высших позвоночных. Однако иммунная система рыб имеет некоторые особенности. Главная из них состоит в том, что у рыб кроветворение и иммунные функции совмещены в одних и тех же органах — в почке, селезенке, тимусе, а у древних рыб — и в так называемом краниальном гемопоэтическом органе в черепе и в лимфоидных образованиях эпикарда. Таким образом, гемопоэтические органы рыб одновременно являются и органами иммунитета, тогда как у млекопитающих защитные реакции и гемопоэз пространственно разделены. Пока нет объективных данных, позволяющих разделить иммунные органы рыб на центральные и периферические, поскольку и развитие клеток, участвующих в иммунном ответе, и реализация ими своих функций происходит в одних и тех же органах.

Рыбы отличаются от наземных позвоночных и большим разнообразием врожденных факторов иммунитета, обеспечивающих немедленное реагирование на внешнее воздействие. Неспецифические факторы, и прежде всего гуморальные, действуют в большем, чем специфические факторы, интервале внешних воздействий.

Адаптивная составляющая иммунной системы рыб развита недостаточно по сравнению с таковой млекопитающих. В ответ на контакт с антигеном рыбы продуцируют антитела одного класса и низкой специфичности. Для развития специфической иммунореактивности рыб требуется больше времени, вплоть до нескольких недель; более того, есть данные и об отсутствии синтеза специфических антител при иммунном ответе у рыб. Не всегда у рыб происходит увеличение аффинности антител и формируется выраженная иммунологическая память, что служит причиной слабых различий между первичным и вторичным ответом на чужеродный агент.

Наконец, для нормальной жизнедеятельности рыб, как и любых водных животных, особое значение имеют факторы среды обитания, а при промышленном разведении — условия содержания животных.

## **2.6. Болезни рыб**

### ***2.6.1. Краткая характеристика болезней рыб***

Болезни рыб по своей природе могут быть разделены на две большие группы: заразные и незаразные болезни [Бауер и др., 1981]. К заразным относятся болезни, возбудителями которых являются паразиты, бактерии, вирусы, грибы и водоросли.

Болезни, вызываемые бактериями, вирусами, грибами и водорослями, называются инфекционными, а заболевания, вызываемые паразитами животного происхождения, — инвазионными. К последней группе возбудителей относятся одноклеточные паразиты, паразитические черви и паразитические рачки.

Незаразные болезни не имеют возбудителя и развиваются из-за использования неполноценных кормов, влияния неблагоприятных условий среды обитания, травм, отравлений.

Некоторые заболевания могут быть вызваны одновременно действием как возбудителя, так и неблагоприятных условий обитания, или возбудителей разного систематического положения. Такие болезни называют болезнями смешанной природы.

#### 2.6.1.1. Инфекционные заболевания

Инфекционные заболевания рыб изучены недостаточно, что связано с большим количеством возбудителей, их специфическим действием на определенные виды и даже популяции рыб, а также неоднозначностью влияния факторов среды обитания на восприимчивость рыб. Рыбы устойчивы ко многим возбудителям инфекционных заболеваний млекопитающих, например, к *Bacillus typhi abdominalis*, *Bacillus paratyphi A* [Лукьяненко, 1989]. Возбудители, введенные рыбам внутривентрально, не погибают, а экссудат, взятый у инфицированной рыбы, способен вызвать болезнь у морской свинки и ее гибель, что указывает на то, что микроорганизмы не разрушаются и сохраняют патогенность. В то же время, рыбы устойчивы не только к бактериям, но и к некоторым вирусам и токсинам, вызывающим болезни млекопитающих (к примеру к токсину *Clostridium botulinum*).

Существуют внутриклассовые различия в иммунитете к инфекциям. Например, *Aeromonas salmonicida* вызывает фурункулез лососевых, тогда как для представителей других семейств этот микроорганизм — нормальный сапрофит. Широко варьирует устойчивость к патогенным микроорганизмам внутри семейств [Karunasagar et al., 1991; Piacentini et al., 1991]. Так, к возбудителю заболевания эритроцитов у лососевых наиболее восприимчивы тихоокеанские лососи *Oncorhynchus kisutch* и *Oncorhynchus tshawytscha*, а радужная форель и красnogорлый лосось *Oncorhynchus clarki* заболевают реже [Piacentini et al., 1991]. Для каждой популяции в пределах одного вида существуют свои характеристики устойчивости к заболеваниям [Houghton et al., 1991; Beacham & Evelyn, 1992]. Например, карпы из нескольких прудовых хозяйств Украины имеют различия в биохимических показателях сыворотки крови и иммунном ответе на вирусную инфекцию [Балахнин и др., 1989]. Существует и индивидуальность иммунитета, заключающаяся в том, что в пределах одной популяции степень зараженности, возможность заболевания и его исход отличны у разных особей. Фактор возраста проявляется в изменении биохимических показателей сыворотки крови (к примеру концентрации иммуноглобулинов, активности комплемента [Ourth et al., 1991]) и восприимчивости ко многим бактериальным, вирусным и микозным заболеваниям. В частности, краснухой карпов — заболеванием, вызываемым несколькими видами бактерий, — более всего страдают трехлетние рыбы. Двухлетние особи в два раза устойчивее к заболеванию, а однолетние карпы практически не болеют [Лукьяненко, 1989].



### *2.6.1.2. Инвазионные заболевания*

Паразиты животного происхождения (главным образом паразитические черви) локализуются в самых различных органах рыбы — на поверхности кожи, под чешуей, на жабрах, в толще кожи, соединительной ткани и подкожной клетчатке, в кишечнике, в полости тела, в стенках плавательного пузыря и на серозных покровах полости тела, в желчном пузыре и печени, в хрусталике глаза, в кровеносных сосудах, в мышцах и лучах плавников [Васильков, 1999]. В зависимости от образа жизни паразиты могут быть постоянными, длительное время пребывающими в организме хозяина, и временными, проводящими лишь часть своего жизненного цикла на теле или внутри организма хозяина. Паразиты рыб вызывают разрушение тканей рыб, закупорку сосудов и непроходимость кишечника, нарушают пищеварение и выделяют токсины, отравляющие организм и нарушающие работу внутренних органов. Все это не только непосредственно вызывает болезнь у рыб, но и опосредованно — через супрессию иммунного ответа и повышение восприимчивости рыб к другим возбудителям — увеличивает вероятность гибели рыб от других заболеваний.

В отличие от инфекционных болезней, приводящих к формированию иммунной памяти и невосприимчивости к повторному заражению, заболевания, вызываемые паразитами, особенно гельминтами, редко вызывают образование устойчивого иммунитета к возбудителю. В основном, при иммунном ответе на паразитарное вторжение активируются факторы неспецифического иммунитета рыб (комплемент, С-реактивный протеин, гемолизины и лектины) [Jones, 2001]. Однако есть данные, что в реакции организма рыб на инвазию участвуют и

специфические иммунные механизмы [Buchmann et al., 2001]. По-видимому, стойкий иммунитет к паразитам у рыб образуется чаще в том случае, если рыбы подверглись интенсивной инвазии в молодом возрасте.

#### 2.6.1.3. Болезни смешанного типа

Известно, что очень часто в водоемах рыбных хозяйств и рыбах, содержащихся в этих водоемах, можно обнаружить возбудителей многих тяжелых заболеваний [Бауер, 1981]. Однако возбудители необязательно вызывают заболевание. Лишь определенные условия, возникающие либо в самом организме рыбы, либо в среде обитания, способствуют резкому увеличению численности возбудителя, усилению его вирулентности и возникновению болезни. Условно-патогенные симбионты рыб при неблагоприятных условиях среды обитания могут привести к развитию болезней рыб и их гибели [Наумова и др., 1997; Кондратьева и др., 2002]. К основным предрасполагающим к возникновению болезни факторам относятся резкие изменения среды обитания, в результате которых в организме рыб развивается стресс. Многие заболевания могут, с одной стороны, снизить устойчивость организма рыб и вызвать вторичную инфекцию, действуя как фактор стресса [Васильков, 1999], а с другой стороны — активировать иммунные реакции. Окончательный исход таких заболеваний будет определяться тем, какое воздействие окажется более сильным. Например, экспериментальное заражение атлантического лосося вирусом инфекционного некроза поджелудочной железы и последующее заражение бактериями *Vibrio salmonicida* приводит к большей смертности рыб по сравнению с животными, подвергнутыми воздействию только *Vibrio salmonicida*, тогда как смертность рыб при вторичном заражении вирусом инфекционной анемии

была ниже в группах, зараженных предварительно вирусом инфекционного некроза поджелудочной железы [Johansen & Sommer, 2001].

### 2.6.2. Методы профилактики и лечения заболеваний рыб

#### 2.6.2.1. Использование химиотерапевтических препаратов

Лекарственные средства профилактики и лечения инфекционных заболеваний рыб, применяемые в современной практике рыбоводства, подразделяют на три основные группы.

*Антибиотики* — специфические продукты жизнедеятельности или их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов или к злокачественным опухолям, избирательно задерживая их рост или полностью подавляя их развитие [Егоров, 1994; Ковалев и др., 1989]. Антибиотики стимулируют отдельные биохимические процессы в организме животных, поэтому их применяют не только для лечения и профилактики инфекционных и неинфекционных заболеваний, но и для стимуляции роста животных [Rodgers, 1991].

В лечебной практике используют около 50 антибиотиков, синтезируемых в основном штаммами, принадлежащими к различным видам рода *Streptomyces* (*Actinomyces*). Кроме того, антибиотики образуются бактериями (полимиксины, грамицидины, бацитрацины) и грибами (пенициллины, цефалоспорины). Небольшое число антибиотиков (левомецетин, циклосерин) получают методом химического синтеза. Антибиотики принадлежат к различным классам химических соединений. Классификация чаще всего основывается на происхождении,

механизме действия, спектре действия и химическом строении антибиотиков [Егоров, 1994].

*Сульфаниламидные препараты* — большая группа лекарственных веществ, основу строения которых составляет сульфаниловая (парааминобензойная) кислота. Сульфаниламидные препараты являются производными белого стрептоцида. Сульфаниламиды относятся к химиотерапевтическим средствам широкого антибактериального спектра действия, так как они подавляют рост и развитие многих видов грамположительных и грамотрицательных бактерий. Сульфаниламиды действуют и на макроорганизм: оказывают жаропонижающее воздействие, снижают повышенную реактивность организма, хотя при этом подавляют гемопоэз. Благодаря сочетанию таких свойств сульфаниламидные препараты используют при различных заболеваниях, сопровождающихся воспалительными процессами [Соколов и др., 2000].

*Нитрофураны* — вещества, полученные из 2-замещенного фурана присоединением к нему нитрогруппы в пятое положение (5-нитро2-фурфулиденгидразоны). Антимикробная активность нитрофуранов проявляется как в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, так и представителей подкласса *Coccidiida*, родов *Trypanosoma*, *Leptospira*, возбудителей грибковой инфекции и ряда крупных вирусов. Нитрофураны эффективны против антибиотико- и сульфаниламидоустойчивых штаммов возбудителей. Некоторым препаратам этого ряда свойственна противоопухолевая активность [Соколов и др., 2000].

Наиболее приемлемым и целесообразным методом, повышающим эффективность химиотерапии, является рациональное применение сочетаний антимикробных препаратов. Использование комбинированной химиотерапии в первую очередь рассчитано на максимально возможный охват потенциальных возбудителей заболевания и на достижение бактерицидного эффекта. В случае смешанной инфекции при применении сочетаний антибактериальных препаратов учитывают то, что каждый компонент активен в отношении определенного возбудителя. В результате одновременного использования нескольких соединений можно уменьшить курсовую дозу каждого из препаратов, входящих в комплекс, тем самым снижая вероятность возникновения побочных реакций со стороны макроорганизма.

Для профилактики и лечения инвазионных болезней рыб, главным образом заболеваний, вызванных гельминтами, применяют *антигельминтики* растительного происхождения (сантонин, папоротник мужской, камала, семена тыквы) и синтетические (медный купорос, фенотиазин, фенасал, левамизол и другие). Действие антигельминтных препаратов обычно распространяется на определенную группу паразитических червей, реже — на отдельный вид гельминтов и зависит от стадии развития паразита, его локализации в организме, времени применения. Препараты вызывают гибель паразитов, их оцепенение, выведение паразита из органа хозяина или рассасывание гельминта в организме рыбы [Васильков, 1999; Соколов и др., 2000].

В зависимости от целей использования препарата, степени зараженности рыб и технических средств, имеющихся в распоряжении, используют способы введения лекарств перорально, подкожно, внутримышечно, внутривенно и наружно.

#### *2.6.2.2. Вакцинация*

Применение химиотерапевтических веществ в рыбном хозяйстве как средств профилактики и лечения инфекционных заболеваний менее предпочтительно, чем использование вакцин в тех же целях, так как лекарственные препараты, применяемые для лечения рыб, могут оказать нежелательный эффект при попадании в организм человека с пищей. Поэтому в современном рыбоводстве наблюдается тенденция проводить как можно более широкую вакцинацию рыб в хозяйствах для того, чтобы предотвратить развитие инфекционных заболеваний.

Изменения иммунитета у рыб (повышение устойчивости к заболеваниям), вызванные введением в организм непатогенных форм болезнетворных микроорганизмов или их токсинов, исследуются и используются сейчас повсеместно. Эффект вакцинации зависит от вида и дозы антигена, места его введения, периодичности антигенной стимуляции и общего состояния иммунной системы рыб [Вихман, 1984]. Чаще всего в виде вакцины используют убитые или нежизнеспособные микроорганизмы, потерявшие способность вызывать заболевание, но сохранившие свой антигенный состав. Инактивируют возбудителей нагреванием, ультразвуком, изменением pH или химическими веществами, например формалином [Obach & Laurencin, 1991; Hjeltnes et al., 1989; Moore et al., 1990].

Вакцинацию проводят, используя и живые клетки — либо не вызывающий у рыб заболевания штамм, либо бактерии, ослабленные длительным (больше года) культивированием при пониженной температуре на минимальной среде [Woo & Li Sen, 1990]. Ослабленные таким образом микроорганизмы вызывают очень вялое протекание болезни, но способствуют созданию стойкого иммунитета к возбудителю.

Широко применяют в качестве вакцин экстрагированные липополисахариды и белки клеточных стенок бактерий и оболочек вирусов, нативные и инаktivированные внеклеточные продукты бактерий [Hastings & Ellis, 1990; Velji et al., 1990; Velji et al., 1991; Ford & Thune, 1992]. Кроме того, в последнее время получают вакцины методом молекулярного клонирования ДНК вирусов, экспрессии генов в клетках прокариот или эукариот и выделения рекомбинантных белков [Thiry et al., 1991].

Некоторые исследования показывают, что использование комбинированных вакцин, например нескольких видов микроорганизмов или клеток и их экзотоксинов, повышает устойчивость рыб к заболеваниям [Santos et al., 1991].

Немалую роль в эффективности вакцины играют доза антигена и употребление адъювантов, а также способ введения. Так, использование неполного адъюванта Фрейнда и мурамил-дипептида менее способствует развитию иммунитета, чем полный адъювант Фрейнда [Исаева и др., 1992]. Наиболее эффективным методом введения вакцин считается внутрибрюшинное введение, несмотря на его сложность [Lillehaug, 1989a; 1989b; Obach & Laurencin, 1991; Santos et al., 1991, Thiry et al., 1991; Velji et al., 1990; Velji et al., 1991]. Показано, что

по сравнению с ваннами и опрыскиванием рыб этот метод более эффективен для целей вакцинации и более выгоден с экономической точки зрения.

Введение рыбам вакцин приводит к повышению титра специфических антител сыворотки, усилению фагоцитарной активности клеток. Бактерицидные показатели крови и слизи при этом значительно не изменяются, что говорит о том, что вакцины действуют преимущественно на реакции клеточного иммунитета [Исаева и др., 1992]. Возникновение устойчивой памяти в процессе вакцинации зависит от многих факторов. Поэтому для успешной вакцинации необходим комплексный подход, включающий создание соответствующей экологической базы, селекцию рыб на иммунный ответ и стрессоустойчивость, увеличение антигенного состава вакцины, применение иммуностимулянтов и разработку индивидуального подхода к каждой комбинации видов рыб и возбудителей заболеваний.

#### *2.6.2.3. Пассивная иммунизация*

Пассивная иммунизация заключается в том, что в организм вводят готовые факторы иммунитета — антитела, сыворотку, клетки селезенки и почек иммунных рыб [Вихман, 1984]. После такой иммунизации в организме реципиента начинают нарастать собственные антитела, что позволяет заболевшим рыбам быстро справиться с болезнью. Однако иногда ход заболевания осложняется тем, что в ответ на введенные факторы в организме начинается реакция отторжения.

#### *2.6.2.4. Повышение иммунитета путем селекции*

Селекция рыб на повышение устойчивости к инфекционным заболеваниям основана на методах массового отбора рыб по фенотипу и экспериментального



заражения контрольных экземпляров. Кроме того, разрабатываются методы сравнительного генетического анализа родителей и гибридов первого поколения. Селекция проводится в течение нескольких десятилетий (первые опыты были сделаны в двадцатых годах прошлого столетия) и является довольно эффективным способом снижения заболеваемости рыб [Лукияненко, 1989; Roed et al., 1990].

### 3. ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью работы явилось изучение реакций врожденного и приобретенного иммунитета рыб в норме и патологии в естественных и экспериментальных условиях.

В качестве основного объекта исследования были выбраны радужная форель *Salmo gairdneri* (Richardson, 1836), широко используемая при промышленном разведении, северная навага *Eleginus navaga* (Pallas, 1811) и беломорская треска *Gadus morhua maris-albi* (Derjugin, 1920) — распространенные в Белом море виды рыб.

Были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать параметры врожденного иммунитета радужной форели, наваги и трески в норме и при патологии в зависимости от инфекции и зараженности паразитами.
2. Сравнить действие лекарственных препаратов в лечении энтерита радужной форели и выбрать наилучший терапевтический агент.
3. Оптимизировать метод твердофазного иммуноферментного анализа и разработать экспериментальную тест-систему для изучения взаимодействия сывороток рыб с возбудителями заболеваний.
4. Выявить специфическое взаимодействие сывороток радужной форели с возбудителями энтерита с помощью разработанной тест-системы.

## 4. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 4.1. Объекты

#### 4.1.1. Радужная форель *Salmo gairdneri* (Richardson, 1836)

Отряд лососеобразные (*Salmoniformes*)

Семейство лососевые (*Salmonidae*)

Род настоящие лососи (*Salmo*)

#### 4.1.2. Северная навага *Eleginus navaga* (Pallas, 1811)

Отряд трескообразные (*Gadiformes*)

Семейство тресковые (*Gadidae*)

Род наваги (*Eleginus*)

#### 4.1.3. Беломорская треска *Gadus morhua maris-albi* (Derjugin, 1920)

Отряд трескообразные (*Gadiformes*)

Семейство тресковые (*Gadidae*)

Род треска (*Gadus*)

### 4.2. Методы

#### 4.2.1. Отлов и содержание морских рыб

Отлов рыб производили ставными мережами, которые ставили накануне обследования рыб. Пойманную живую рыбу вынимали из мережи и перевозили в

емкостях с морской водой. До обработки рыбу содержали в садках, подвешенных к плавучему причалу в море.

#### ***4.2.2. Клинический осмотр рыб***

При прижизненном наблюдении рыб определяли поведение рыб в садках (подвижность, положение относительно поверхности воды и стен садков), оценивали состояние и окраску покровов, состояние жабр и ануса.

#### ***4.2.3. Вскрытие рыб и осмотр при вскрытии***

Перед проведением вскрытия рыб взвешивали, измеряли расстояние от переднего конца головы до конца чешуйного покрова и до конца хвостового плавника. Вскрытие рыб проводили вдоль срединной линии брюшка, от анального отверстия до жаберной полости. При вскрытии определяли состояние внутренних органов рыб, брали соскобы для проведения бактериологического и паразитологического исследования.

#### ***4.2.4. Бактериологическое исследование***

Первичные посевы микроорганизмов из кишечника рыб и микроорганизмов, находящихся на жаберных лепестках рыб, проводили на мясопептонный агар (МПА), мясопептонный бульон (МПБ) и среду ПДГ (пептон, дрожжевой экстракт, глюкоза — концентрация всех веществ 1 г/л). При исследовании микроорганизмов морских рыб в среды добавляли хлорид натрия (2%). Бактериологические исследования проводили стандартными методами согласно методическим указаниям МСХ РФ и руководствам по бактериологии [Бауер и др., 1981].

Выделенные бактерии идентифицировали по результатам биохимических и морфологических исследований [Берджи, 1997].

#### ***4.2.5. Паразитологическое исследование***

Паразитологические исследования проводили по стандартным методикам [Бауер и др., 1981; Быховская-Павловская, 1985]. Сбор паразитов производился методом частичных паразитологических вскрытий рыб. Степень зараженности рыб оценивалась долей зараженных рыб (экстенсивностью инвазии), абсолютным количеством паразитов на особь (интенсивностью инвазии) и количеством паразитов одного вида, приходящимся на единицу массы (1 г) тела особи хозяина (удельной интенсивностью инвазии).

#### ***4.2.6. Взятие крови и получение сыворотки***

Взятие крови у форели проводили из хвостовой артерии, у трески и наваги — из сердца, у кролика — из краевой вены уха [Кондратьева и др., 2001]. Каплю крови наносили на предметное стекло для приготовления мазка. Остальную кровь оставляли для получения сыворотки. После формирования кровяного сгустка сыворотку отделяли центрифугированием при 6 000 g в течение 5 мин, разливали по аликвотам и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  (в зависимости от условий эксперимента допускали хранение сыворотки при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение краткого периода времени).

#### ***4.2.7. Подсчет форменных элементов крови***

Исследование форменных элементов крови рыб (эритроцитов, гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов) проводили на мазках, фиксированных метанолом и окрашенных по Романовскому-Гимза [Иванова, 1983]. Дифференцированный

подсчет клеток крови проводили на мазках под иммерсионным объективом при 1 000-кратном увеличении. Содержание клеток определяли как долю клеток определенного типа в общем количестве подсчитанных элементов крови. Подсчет эритроцитов и недифференцированный подсчет лейкоцитов проводили также в камере Горяева.

#### **4.2.8. Определение скорости оседания эритроцитов**

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) в крови определяли по Панченкову [Иванова, 1983] в капиллярах Панченкова, смешивая кровь с 5% раствором лимоннокислого натрия в соотношении 1:4.

#### **4.2.9. Определение концентрации гемоглобина в крови**

Концентрацию гемоглобина в крови определяли по стандартной методике [Иванова, 1983] с использованием стандартного реактива компании «Биоконт» (Россия) на фотоэлектроколориметре КФК-2-УХЛ 4.2 (Россия) при длине волны 540 нм.

#### **4.2.10. Определение цветного показателя крови**

Цветной показатель крови определяли для выражения степени насыщенности эритроцитов гемоглобином по формуле:

$$ЦП = \frac{Г}{Э} \quad (1),$$

где ЦП — цветной показатель крови (пг гемоглобина на эритроцит), Г — концентрация гемоглобина (г/л), Э — концентрация эритроцитов (млрд/мл).

#### ***4.2.11. Двуступенчатый электрофорез сывороток крови рыб в полиакриламидном геле, содержащем додецил-сульфат натрия, в восстанавливающих условиях***

Электрофорез иммуноглобулинов рыб, кролика и сывороток рыб проводили в 5/15% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем додецил-сульфат натрия (ДСН) и 2-меркаптоэтанол (2-МЭ) в качестве восстанавливающего агента, по методу Laemmli [Клаус, 1990] с изменениями (состав растворов для электрофореза представлен в табл. 1). Для инициации и катализа процесса полимеризации акриламида использовали персульфат аммония (ПСА) и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД). Иммуноглобулины рыб и кроличьи иммуноглобулины вносили в количестве 3,25 мкг в карман. Сыворотки рыб разводили в 20 раз и вносили в количестве 20 мкл в карман (1 мкл исходной сыворотки). Для маркирования молекулярной массы использовали b-субъединицу фосфоорилазы (97,4 кДа), бычий сывороточный альбумин (БСА) (66,6 кДа), карбоангидразу (29,0 кДа), соевый ингибитор трипсина (20,1 кДа), лизоцим (14,4 кДа). Напряжение при прохождении образцов концентрирующего геля — 180 В, сила тока — 25 мА; при вхождении образцов в разделяющий гель силу тока увеличивали до 50 мА.

#### ***4.2.12. Компьютерная обработка электрофореграмм***

Электрофореграммы сывороток крови рыб обрабатывали с помощью оригинального программного обеспечения, предоставленного доцентом кафедры клеточной физиологии и иммунологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова А.В. Киташовым и позволяющего проводить качественный и

**Табл. 1.** Состав растворов для двухступенчатого электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в восстанавливающих условиях

<i>Концентрирующий гель</i>	
Акриламид / метилен-бис-акриламид (29,2% / 0,8%)	5%
Трис-НСl, рН 6,8	375 мМ
ДСН	0,1%
<i>Разделяющий гель</i>	
Акриламид / метилен-бис-акриламид (29,2% / 0,8%)	15%
Трис-НСl, рН 8,8	375 мМ
ДСН	0,1%
<i>Буферный раствор для образцов</i>	
Трис-НСl, рН 6,8	125 мМ
Глицерин	10%
ДСН	0,2%
Бромфеноловый синий	0,01%
2-МЭ	2%
<i>Электродный буферный раствор, рН 8,3</i>	
Трис	25 мМ
Глицин	195 мМ
ДСН	0,1%
<i>Раствор для фиксации и окрашивания</i>	
Этанол	40%
Уксусная кислота	10%
Кумасси ярко-синий R-250	0,1%
<i>Раствор для обесцвечивания</i>	
Этанол	40%
Уксусная кислота	10%



количественный анализ окрашенных белковых полос. Гели сканировали планшетным сканером Canoscan D660U фирмы Canon с оптическим разрешением 600 dpi. Изображение дорожки представляли как ортогональную матрицу точек с яркостью 0–255 единиц, сонаправленную одной из осей с направлением движения маркеров.

Значения яркости по каждому ряду пикселей, перпендикулярному движению маркеров, усредняли. Полученный профиль оптической плотности подвергали обработке накопительным фильтром:

$$\bar{P}_i = \frac{\sum_{k=i-n/2}^{i+n/2} P_k}{n} \quad (2),$$

где  $\bar{P}_i$  — результирующая яркость,  $P_k$  — исходная яркость пикселя, находящегося на определенном удалении от исследуемого. Емкость фильтра  $n$  выбирали равной 5 при средней длине геля 1 300 пикселей.

#### 4.2.13. Определение концентрации лизоцима в сыворотке

Концентрацию лизоцима в сыворотках рыб определяли по методу Лабинской [Лабинская, 1978]. *Micrococcus lysodeikticus*, штамм № 137, предоставлен музеем микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ и выращен на среде МПБ. В качестве стандарта для калибровки использовали лизоцим (Sigma, США). Сыворотки рыб разводили в 5,5 раз в 7 мМ натриево-фосфатном буфере, pH 6,2. Оптическую плотность измеряли на однолучевом спектрофотометре фирмы Jasco, модель Uvides 4, при длине волны 540 нм через 15 и 180 с.

#### **4.2.14. Выделение иммуноглобулинов**

Фракцию иммуноглобулинов из сыворотки рыб и кролика осаждали насыщенным при 4°C раствором сульфата аммония, pH=7,0 по стандартной методике [Кэтти, 1991; Кондратьева и др., 2001]. К сыворотке рыб добавляли равный объем раствора сульфата аммония (конечная концентрация 50%), к сыворотке кролика — 1/3 объема (конечная концентрация 33%). Осажденные иммуноглобулины диализовали против 0,1 М фосфатного буфера, pH=7,2, и затем против 0,1 М или 10 мМ буферного раствора Трис-HCl, pH=8,0. Фракцию IgM из сыворотки рыб очищали гель-фильтрацией на колонке с сефакрилом S300 (Pharmacia, Швеция), используя 0,1 М буферный раствор Трис-HCl, pH=8,0, содержащий 0,15 М NaCl и 0,01% NaN<sub>3</sub>. Фракцию IgG из сыворотки кролика затем очищали на колонке с ДЭАЭ-сефарозой (Pharmacia, Швеция), уравновешенной 10 мМ буферным раствором Трис-HCl, pH=8,0. Элюцию проводили 0–500 мМ раствором NaCl. Чистоту белка определяли методом электрофореза в ПААГ, содержащем ДСН, в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

#### **4.2.15. Определение концентрации белка по методу Бредфорд**

При определении концентрации белка по методу Бредфорд [Bradford, 1976] в качестве стандарта использовали БСА. Для окрашивания использовали кумасси ярко-синий R-250 (Sigma, США). Определение оптической плотности проводили на фотоэлектроколориметре КФК-2-УХЛ 4.2, Россия, при длине волны 590 нм.

#### 4.2.16. Спектрофотометрическое определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли также на спектрофотометре U-2000 фирмы Hitachi (Япония) по формуле:

$$C = 1,45D_{280} - 0,74D_{260} \quad (3),$$

где  $C$  — концентрация белка в пробе (мг/мл),  $D_{280}$  и  $D_{260}$  — оптическая плотность пробы при длине волны 280 и 260 нм соответственно, 1,45 и 0,74 — коэффициенты молярной экстинкции белков и нуклеиновых кислот при соответствующих длинах волн [Строев и Макарова, 1986].

#### 4.2.17. Получение антисыворотки

Для получения поликлональной антисыворотки к иммуноглобулинам рыб использовали кролика массой 2,5 кг. Иммунизацию проводили троекратно иммуноглобулинами рыб: первый раз подкожно в четыре точки (400–500 мкг белка в полном адъюванте Фрейнда), через 45 дней внутрибрюшинно (та же доза белка в полном адъюванте Фрейнда) и третий раз через 45 дней внутривенно (та же доза белка без адъюванта). Использовали полный и неполный адъювант Фрейнда производства фирмы Difco Laboratories (США). Полученную антисыворотку прогревали при 56°C в течение 30 мин и истощали эритроцитами и клетками печени рыб по стандартной методике [Кондратьева и др., 2001].

#### 4.2.18. Получение разрушенных клеток бактерий

Штаммы бактерий *Alcaligenes* sp., № 260, *Citrobacter freundii*, № 244, и *Escherichia coli*, № 52, предоставленные музеем кафедры микробиологии биологического факультета МГУ, наращивали на среде МПА. Бактериальные клетки

отмывали 0,15 М раствором NaCl и затем центрифугировали при 1 000 g в течение 1,5 мин. Осадок подвергали дезинтеграции на ультразвуковом дезинтеграторе Bransonic 1510 при 100 Вт в течение 2 мин при температуре 0°C. После центрифугирования при 10 000 g в течение 15 мин при температуре 0°C в супернатанте (соникате) определяли количество белка по методу Бредфорд и использовали соникат в качестве антигена при дальнейших исследованиях.

#### **4.2.19. Твердофазный иммуноферментный анализ**

Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) проводили на основе стандартной методики [Кэтти, 1991]. Состав используемых растворов приведен в табл. 2.

##### *4.2.19.1. Непрямой твердофазный ИФА для тестирования антисыворотки кролика к иммуноглобулинам рыб*

Панели сенсibilизировали иммуноглобулинами здоровых рыб, разведенными в буфере для сенсibilизации (концентрация 50 мкг/мл). Антисыворотку кролика вносили в 0,1 М фосфатном буфере с твином (разведения 1:10; 1:50; 1:250; 1:1 250, 1:6 250, 1:31 250, 1:156 250). Меченные пероксидазой хрена антитела осла к иммуноглобулинам кролика (конъюгат сделан в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, серия 65) вносили в 0,1 М фосфатном буфере с твином (разведение 1:1 000). В качестве субстрата для ферментативной реакции использовали дигидрохлорид орто-фенилендиамина (ОФД). Интенсивность окрашивания оценивали на вертикальном фотометре Multiscan фирмы Labsystems при длине волны 492 нм.

Табл. 2. Состав растворов для твердофазного иммуноферментного анализа

<i>Буферный раствор для сенсibilизации, pH 9,6</i>	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	15 мМ
NaHCO <sub>3</sub>	35 мМ
<i>Раствор для отмывания</i>	
NaCl	15 мМ
Твин 80	0,05%
<i>Буферный раствор для разведений и инкубации, pH 7,4</i>	
NaCl	0,8%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,02%
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12 H <sub>2</sub> O	0,28%
KCl	0,02%
<i>Буферный раствор для разведений и инкубации, pH 7,4, с твином</i>	
NaCl	0,8%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,02%
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12 H <sub>2</sub> O	0,28%
KCl	0,02%
Твин 80	0,05%
<i>Раствор для блокирования неспецифического связывания</i>	
БСА в растворе для отмывания	1%
<i>Буферный раствор для приготовления субстрата, pH 5,0</i>	
Лимонная кислота	0,15 М
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12 H <sub>2</sub> O	1,19%
<i>Раствор субстрата, pH 5,0</i>	
ОФД	0,4 г/л
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,02%
<i>Раствор, останавливающий ферментативную реакцию</i>	
HCl	2,5 М
<i>Раствор для фиксации бактериальных клеток</i>	
Полилизин	50 мг/л

4.2.19.2. Прямой твердофазный ИФА для стандартизации рабочего разведения конъюгата

Панели сенсibilизировали выделенными из антисыворотки кролика поликлональными антителами к иммуноглобулинам рыб (концентрация 1,6; 8; 40; 200 мкг/мл). Конъюгат вносили в последовательных разведениях (1:500; 1:1 000; 1:2 000; 1:4 000; 1:8 000; 1:16 000).

4.2.19.3. Непрямой твердофазный ИФА для стандартизации рабочей концентрации иммуноглобулинов кролика

Панели сенсibilизировали сывороткой здоровых рыб (разведение 1:20; 1:100; 1:500; 1:2 500). Поликлональные антитела кролика вносили в последовательных разведениях (0,78; 3,125; 12,5; 50; 200 мкг/мл). Конъюгат вносили в разведении 1:4 000.

4.2.19.4. Непрямой твердофазный ИФА для стандартизации рабочего разведения клеток бактерий

Панели предварительно обрабатывали водным раствором полилизина (50 мкг/мл). Суспензию неразрушенных бактериальных клеток *Alcaligenes sp.* наносили в последовательных разведениях (1:1; 1:10; 1:100; 1:1 000; 1:10 000). Все остальные реагенты вносили в таких же количествах, как и в предыдущем опыте.

4.2.19.5. Непрямой твердофазный ИФА для стандартизации рабочей концентрации разрушенных ультразвуком клеток бактерий

Панели сенсibilизировали соникатом бактерий *Alcaligenes sp.* в концентрации 0,1; 1; 10; 100; 1 000 мкг/мл. Иммуноглобулины рыб вносили в

концентрации 50 мкг/мл. Поликлональные антитела кролика к иммуноглобулинам рыб вносили в концентрации 100 мкг/мл. Конъюгат вносили в разведении 1:4 000.

*4.2.19.6. Непрямой твердофазный ИФА для определения взаимодействия сывороток рыб с поверхностными антигенами бактерий*

Панели предварительно обрабатывали полилизинном. На твердой фазе адсорбировались клетки бактерий *Alcaligenes sp.*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*. Суспензию клеток вносили в разведении 1:100. Все остальные реагенты вносили в таких же количествах, как и в предыдущем опыте.

*4.2.19.7. Непрямой твердофазный ИФА для определения взаимодействия сывороток рыб с антигенами разрушенных ультразвуком клеток бактерий*

На твердой фазе адсорбировались антигены разрушенных клеток бактерий *Alcaligenes sp.*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*. Сенсибилизирующие соникаты бактерий наносили в концентрации 10 мкг/мл. Сыворотки рыб вносили в последовательных двукратных разведениях (1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320; 1:640; 1:1 280; 1:2 560; 1:5 120; 1:10 240; 1:20 480; 1:40 960). Поликлональные антитела кролика вносили в концентрации 100 мкг/мл. Конъюгат — в разведении 1:4 000.

*4.2.19.8. Получение данных с помощью компьютера*

Данные от вертикального фотометра передавали на персональный компьютер по интерфейсу RS-232 и подвергали первоначальной обработке с помощью оригинального программного обеспечения, предоставленного доцентом кафедры клеточной физиологии и иммунологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова А.В. Киташовым.

#### 4.2.20. Статистическая обработка данных

При исследовании трески и наваги полученные данные были распределены в интервальный вариационный ряд в соответствии с вариацией количества паразитов, приходящихся на одну особь, — интенсивностью заражения [Лакин, 1990]. Величину классового интервала определяли по формуле:

$$\lambda = \frac{x_{\max} - x_{\min}}{K} \quad (4),$$

где  $\lambda$  — величина классового интервала,  $x_{\max}$  и  $x_{\min}$  — максимальный и минимальный варианты совокупности,  $K$  — число классов.

Число классов вычисляли по формуле Стерджеса:

$$K = 1 + 3,32 \lg n \quad (5),$$

где  $n$  — число членов совокупности.

Поскольку  $\lambda \neq 1$ , полученные результаты распределены в интервальный вариационный ряд.

Нижнюю границу первого классового интервала определяли по формуле:

$$x_n = x_{\min} - \lambda / 2 \quad (6).$$

При разграничении классов верхние границы классов определяли как  $x_n - 1$ , где 1 — точность, принятая при измерении количества паразитов у рыб.

Достоверность полученных данных оценивали с помощью  $t$ -критерия Стьюдента с уровнем значимости 0,05 [Лакин, 1990].



## 5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, иммунная система рыб, подобно иммунной системе млекопитающих и человека, включает врожденную и приобретенную составляющие. Но стратегия защиты у рыб основывается на реакциях врожденного иммунитета, и прежде всего гуморального, позволяющих организму немедленно ответить на агрессию, тогда как адаптивные иммунные механизмы рыб развиты слабо по сравнению со специфической иммунореактивностью высших позвоночных. По данным литературы, одним из основных факторов гуморального врожденного иммунитета у рыб, как и у других животных от моллюсков до млекопитающих, является лизоцим [Fletcher & White, 1973; Fonge et al., 1976; Biggar & Sturgess, 1977; Ourth, 1980; Jolles & Jolles, 1984; Grinde, 1989; Lie et al., 1989; Ottaviani, 1991]. Этот фермент был впервые описан в 1922 г. Флемингом как обнаруженное в тканях и секретах бактериолитическое вещество [Fleming, 1922, цит. по: Paulsen, 2000]. Лизоцим обладает молекулярной массой около 14–15 кДа и гидролизует гликозидные связи пептидогликана бактериальной клеточной стенки. Таким образом он участвует в борьбе с микробной инфекцией, главным образом с грамположительными бактериями.

Однако данные литературы свидетельствуют, что роль лизоцима в организме не ограничивается ферментативной антибактериальной активностью, как предполагалось ранее. Во-первых, показано, что денатурированный нагреванием лизоцим способен разрушать грамотрицательные бактерии в результате встраивания димерного белка в мембрану прокариот и ее нарушения целостности

[Pellegrini et al., 1992]. Во-вторых, выявлено, что он опосредованно стимулирует фагоцитарную активность макрофагов и нейтрофилов [Kokoshis & Di Luzio, 1979], обладает противовоспалительной и слабой хитинолитической активностью [Takada et al., 1994], хотя молекулярные аспекты этих функций лизоцима пока не исследованы.

У рыб фермент встречается главным образом в слизи кожи, где он является компонентом первой линии защиты рыб от инфекции, а также в сыворотке крови, экстрактах тканей различных органов и разрушенных макрофагах [Fletcher & White, 1973; Fonge et al., 1976; Ourth, 1980; Jolles & Jolles, 1984; Grinde, 1989; Lie et al., 1989; Hutchinson & Manning, 1996; Paulsen et al., 2000]. Антибактериальные свойства белка были обнаружены у многих видов рыб [Fletcher & White, 1973; Grinde, 1989; Kondratieva et al., 1995]. Менее известна роль лизоцима в борьбе с паразитарной инвазией. Вероятно, это связано с традиционным отношением к белку как к ферменту, действующему на уникальный бактериальный субстрат. Однако с учетом новых выявленных свойств белка понимание его роли в защите рыб от инвазии представляется необходимым для понимания общего значения лизоцима для организма рыб.

### **5.1. Исследование параметров врожденного иммунитета радужной форели, наваги и трески в зависимости от инфекции и зараженности паразитами**

В данной работе исследовали лизоцим и другие факторы врожденного иммунитета рыб. В качестве модели для изучения врожденных иммунных реакций при бактериальной инфекции была выбрана радужная форель, содержащаяся в

условиях прудового хозяйства. Обычно разводимые в прудовых хозяйствах рыбы характеризуются низкой зараженностью паразитами, но у них часты бактериальные инфекции из-за высокой плотности посадки рыб, нарушений температурных и иных условий содержания и воздействия таких стрессирующих факторов, как перевозки [Бауер и др., 1981; Наумова и др., 1997; Lillehaug A. 1989a]. Моделью для изучения естественной иммунореактивности при паразитарной инвазии были выбраны морские рыбы в естественных условиях обитания — навага и треска Белого моря. Для естественных условий обитания менее свойственны инфекционные болезни, однако паразиты являются характерными симбионтами морских рыб [Гиченок, 1996; Безгачина, 2000].

#### *5.1.1. Изучение иммунологических и гематологических показателей*

##### *радужной форели при энтерите и исследование действия лекарственных препаратов*

В работе использовали двухлеток радужной форели массой 500–800 г. Форель выращивали в рыбном хозяйстве «Волгореченское» и затем перевезли для дальнейшего разведения в рыбное хозяйство «Бисерово», где рыб содержали в садках при повышенной температуре (17–20°C) и недостаточности естественных кормов. Как известно, иммунная система рыб чрезвычайно лабильна и чувствительна к изменениям параметров среды обитания [Bly & Clem, 1991; 1992; Scapigliaty et al., 1999b; Zelicoff et al., 2000]. Стрессы и неблагоприятные условия внешней среды снижают иммунитет рыб, как врожденный, так и приобретенный [Киташова и др., 1997; Наумова и др., 1997; Stave & Roberson, 1985; Landolt, 1989; Houghton & Matthews, 1990; Tatner, 1990; Sheldon & Blazer, 1991; Espelid et al.,

1996]. У исследуемых рыб в результате стресса, вызванного перевозкой, и плохих условий содержания иммунитет был ослаблен, в кишечнике размножились условно патогенные сапрофитные микроорганизмы, и рыбы, в обычных условиях устойчивые к этим симбионтам, заболели энтеритом.

При клиническом осмотре энтерит отмечали у 20–30% рыб. У них наблюдали необычное поведение (держались у стенок садков или у поверхности воды), уменьшение подвижности, потемнение наружных покровов, покраснение и припухлость ануса. При вскрытии обнаруживали геморрагическое воспаление кишечника, увеличение и изменение цвета печени. Из слизи кишечника заболевших рыб выделили бактерии рода *Alkaligenes* и бактерии вида *Citrobacter freundii*. На поверхности кожи обнаружили также эктопаразитов родов *Argulus* и *Diplostomum*. У рыб отмечали низкую концентрацию гемоглобина в крови (34 г/л) и высокую скорость оседания эритроцитов — 19 мм/ч. Заболевание было отнесено к заболеваниям смешанного типа с первичной бактериальной инфекцией.

Заболевших рыб (80 экземпляров) разделили на 5 групп по 15–17 особей. Здоровые рыбы (6-я группа) служили контролем. Рыб содержали в долевых садках при температуре 14–16°C. По данным токсико-биологического исследования, проведенного в Республиканской научно-производственной ветеринарной лаборатории по ГОСТ 134967-92, комбикорм, которым кормили форель, был нетоксичен. Исследование воды из садков показало, что по бактериологическим показателям вода была чистая (общее микробное число — единичные микробные клетки/мл, коли-титр — более 2, патогенных микроорганизмов обнаружено не было). В течение недели рыб адаптировали к экспериментальным условиям, затем

вместе с кормом рыбам давали лекарственные препараты. В эксперименте испытывали четыре препарата, рекомендуемых специалистами для лечения энтерита рыб [Микитюк, 1984; Ковалев и др., 1989]: нифулин, биовит, кормогризин, бацилихин.

Действующими началами комплексного препарата нифулина являются антибиотик гидрохлорид хлортетрациклина, сульфаниламид нитазол и нитрофуран фуразолидон. Нифулин подавляет размножение и развитие многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

Биовит — это высушенная культуральная жидкость бактерий вида *Streptococcus aureofaciens*, продуцента антибиотика хлортетрациклина. Природные тетрациклины оказывают бактериостатическое действие на большое число грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. К антибиотикам этой группы чувствительны бактерии родов *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium* и другие.

Кормогризин является лекарственной формой гризина — препарата группы антибиотиков-стрептотрицинов, синтезируемого бактериями вида *Streptococcus griseus*. Гризин обладает широким антибактериальным спектром действия, но относительно слабой активностью. Он подавляет рост грамположительных и грамотрицательных бактерий и стимулирует рост животных. Кормогризин представляет собой высушенную мицелиальную массу *Streptococcus griseus* с кормовыми добавками.

Бацилихин представляет собой лекарственную форму бацитрацина — антибиотика, относящегося к группе полипептидов и продуцируемого бактериями

вида *Bacillus licheniformis*. Препарат действует главным образом на грамположительные бактерии и почти не влияет на грамотрицательные. Особенно чувствительны к антибиотику бактерии родов *Bacillus* и *Clostridium*. Кроме выраженного лечебного действия бацитрацин оказывает ростостимулирующий эффект.

1-я группа заболевших рыб получала нифулин (1 кг/т корма); 2-я группа — биовит-80 (12,5 кг/т корма); 3-я группа — кормогризин-40 (1,2 кг/т корма); 4-я группа — бацилихин-120 (1,5 кг/т корма). 5-я группа лекарств не получала. Биовит, бацилихин и кормогризин давали в течение двух недель с двухдневным перерывом между неделями. Нифулин — в течение одной недели.

По окончании лечения сравнивали данные клинического, патологоанатомического, бактериологического и паразитологического анализа, а также иммунологические и гематологические показатели леченых и нелеченых рыб.

#### *5.1.1.1. Клинический осмотр и патологоанатомическое исследование*

По данным клинического осмотра рыб (табл. 3) и патологоанатомического исследования (табл. 4) лечение нифулином приводит к наилучшим результатам: у всех рыб группы 1 состояние ануса, кишечника и печени соответствовало норме. Доля внешне здоровых рыб группы 2 (биовит) составляла 70%, при этом внутренние органы были почти без патологии. В группе 3 (кормогризин) доля внешне здоровых рыб была наименьшей (41%), кишечник у рыб выглядел воспаленным, однако печень по виду была нормальной. Только половина рыб группы 4 (бацилихин) внешне выглядела здоровой, тогда как при вскрытии

Табл. 3. Клинический осмотр радужной форели

Группа	Состояние ануса (кол-во рыб, %)		
	Красный, припухлый	Красный	Норма
1 Нифулин	0	0	100
2 Биовит	0	30	70
3 Кормогризин	29	30	41
4 Бацилихин	10	40	50
5 Нелеченые	50	30	20
6 Здоровые	0	0	100

Табл. 4. Осмотр радужной форели при вскрытии

Группа		Кишечник	Печень
1	Нифулин	Норма	Норма
2	Биовит	Слабо воспален	Норма
3	Кормогризин	Сильно воспален	Норма
4	Бацилихин	Сильно воспален	Бледная, с красной каймой
5	Нелеченые	Сильно воспален	Глинистого цвета, с красным краем
6	Здоровые	Норма	Норма



кишечник рыб был сильно воспален, печень увеличена, более светлой окраски, с красной каймой.

#### 5.1.1.2. Бактериологический анализ

В группе 1 (нифулин) вызвавшие заболевание бактерии рода *Alcaligenes* выделили в единичном количестве, а бактерии вида *Citrobacter freundii* не обнаружили (табл. 5). В группе 2 (биовит) оба возбудителя также выделили в единичном количестве, что соответствует норме. В группе 3 (кормогризин) присутствовали в большом количестве бактерии вида *Citrobacter freundii*. Бацилихин (группа 4) не оказал практически никакого воздействия на энтеропатогенные бактерии кишечника рыб: оба вида бактерий присутствовали в значительном количестве.

#### 5.1.1.3. Паразитологический анализ

У всех леченых рыб наблюдали исчезновение сопутствующих эктопаразитов родов *Argulus* и *Diplostomum* на поверхности кожи, что соответствует норме (табл. 5). Единственное исключение обнаружили в группе 4 (кормогризин): у этих рыб выделили паразит рода *Argulus*.

#### 5.1.1.4. Изучение гематологических показателей

Гематологические показатели у всех леченых рыб оказались лучше, чем у нелеченых (табл. 6). Концентрация гемоглобина немного превысила норму ( $83 \pm 3$  г/л) и составила  $88 \pm 2$  г/л в группе 1 (нифулин);  $89 \pm 1$  г/л в группе 2 (биовит);  $91 \pm 4$  г/л в группе 3 (кормогризин) и  $86 \pm 1$  г/л в группе 4 (бацилихин). СОЭ приблизилась к нормальной ( $7 \pm 1$  мм/ч) у всех рыб, за исключением группы 3

Табл. 5. Бактериологический и паразитологический анализ радужной форели

Группа	Бактерии		Сопутствующие паразиты	
	<i>Alcaligenes</i> <i>sp.</i>	<i>Citrobacter</i> <i>freundii</i>	<i>Argulus sp.</i>	<i>Diplostomum</i> <i>sp.</i>
1 Нифулин	+	—	—	—
2 Биовит	+	+	—	—
3 Кормогризин	—	++	+	—
4 Бацилихин	++	+++	—	—
5 Нелеченые	+++	+++	+	+
6 Здоровые	+	+	—	—

«—» отсутствуют

«+» присутствуют в единичном количестве

«++» присутствуют в большом количестве

«+++» массовые колонии

Табл. 6. Гематологические показатели радужной форели

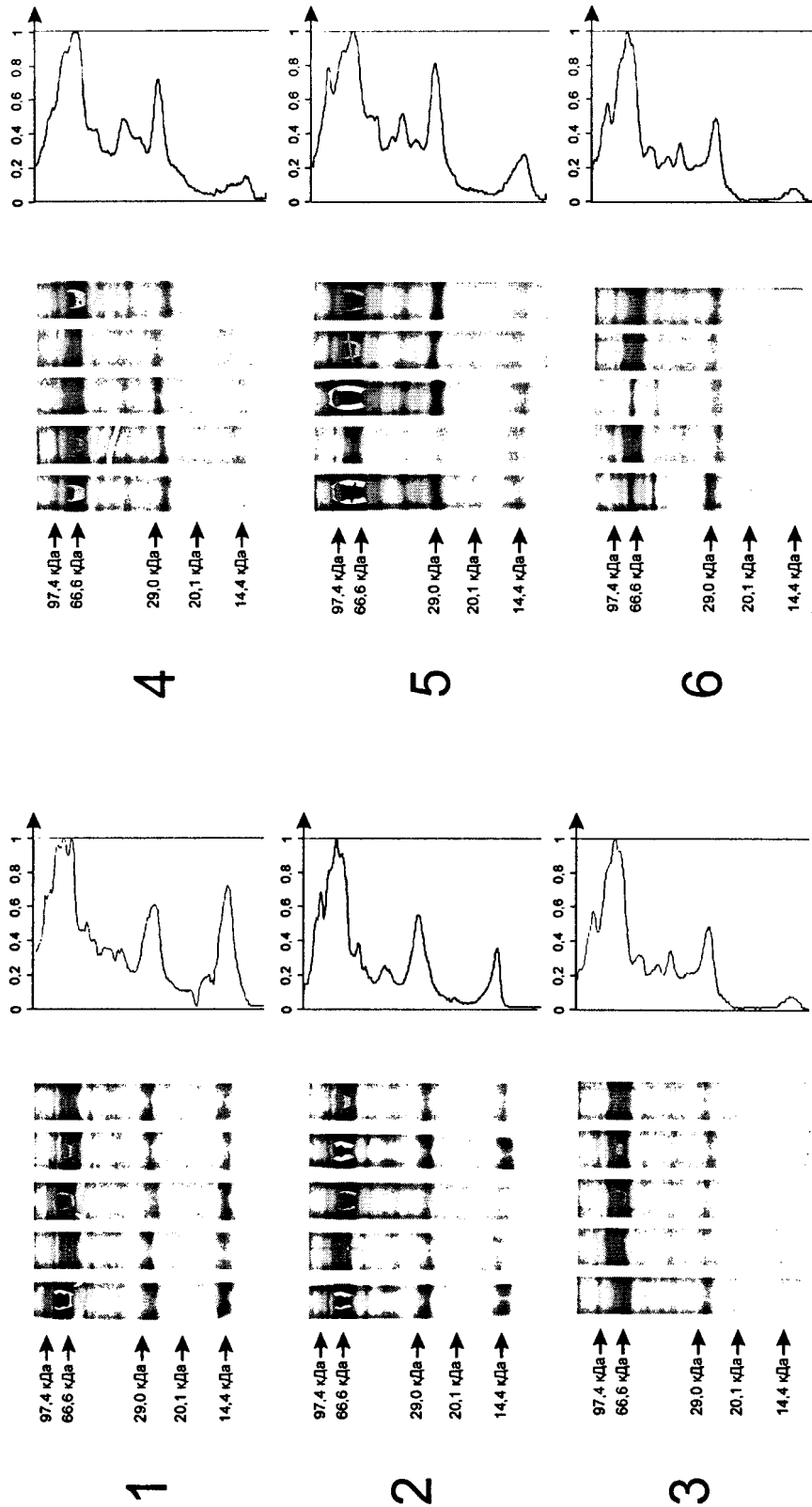
Группа		Концентрация гемоглобина (г/л)	СОЭ (мм/ч)
1	Нифулин	$88 \pm 2$	$10 \pm 1$
2	Биовит	$89 \pm 1$	$9 \pm 1$
3	Кормогризин	$91 \pm 4$	$19 \pm 4$
4	Бацилихин	$86 \pm 1$	$9 \pm 1$
5	Нелеченые	$34 \pm 5$	$19 \pm 5$
6	Здоровые	$83 \pm 2$	$7 \pm 1$

(кормогризин). У этих рыб СОЭ соответствовала показателям больных нелеченых рыб ( $19 \pm 5$  мм/ч), тогда как в других группах она уменьшилась:  $10 \pm 1$  мм/ч в группе 1 (нифулин);  $9 \pm 1$  мм/ч в группе 2 (биовит);  $9 \pm 1$  мм/ч в группе 4 (бацилихин).

#### *5.1.1.5. Сравнение электрофореграмм сывороток рыб*

Метод электрофореза белковых образцов в полиакриламидном геле, содержащем додецил-сульфат натрия, в восстанавливающих условиях позволяет проводить качественный анализ содержащихся в образце фракций белка и определять их кажущуюся молекулярную массу [Клаус, 1990]. Из литературы известно, что этот метод используется для исследования белковых фракций сывороток рыб [Rehulka, 1993], но данные о его применении встречаются редко, тогда как он позволяет быстро и эффективно оценить отклонения в физиологическом и иммунологическом состоянии рыб.

В настоящей работе для обработки данных электрофореза использовали оригинальное программное обеспечение, что позволило визуально разделить, количественно оценить и сравнить белковые фракции в сыворотках рыб. При исследовании сывороток рыб методом электрофореза (рис. 7) оказалось, что в сыворотках экспериментальных групп присутствуют новые фракции белков, не обнаруженные у здоровых рыб. Одна из таких фракций имеет кажущуюся молекулярную массу около 14–15 кДа. Наиболее четко эта фракция выражена у рыб группы 1 (нифулин). На профиле оптической плотности электрофореграммы пик, соответствующий этой фракции, у группы 1 максимален. У рыб, получавших остальные лекарственные препараты, и у больных нелеченых рыб



**Рис. 1.** Двухступенчатый электрофорез сывороток крови радужной форели в ПААГ, содержащем ДСН, в восстанавливающих условиях. Слева: группы рыб (1 — нифулин, 2 — биовит, 3 — кормогризин, 4 — бацилихин, 5 — нелеченные, 6 — здоровые); стрелками указана молекулярная масса. Справа: усредненный для группы профиль оптической плотности электрофореграммы (по оси ординат указана относительная оптическая плотность)

фракция выражена слабее. У здоровых рыб (группа 6) на электрофореграмме фракция не видна. Кажущаяся молекулярная масса этой фракции составила около 14,5 кДа, что позволило предположить, что фракция соответствует лизоциму. Это предположение подтвердили при определении концентрации лизоцима в сыворотках рыб.

#### *5.1.1.6. Определение концентрации лизоцима в сыворотках рыб*

По данным литературы, активность лизоцима в крови радужной форели высока по сравнению с рыбами других видов даже в пределах семейства лососевых [Grinde et al., 1988; Grinde, 1989; Lie, 1989]. Определение концентрации лизоцима в сыворотках исследуемых в данной рыб по методу Лабинской показало, что у них концентрация лизоцима составила 1,5–5,6 мкг/мл. По сравнению с группой 6 (здоровые рыбы) во всех группах заболевших рыб концентрация лизоцима повышена (рис. 8). В группе 1 (нифулин) увеличение концентрации лизоцима в сыворотке максимально и почти в четыре раза больше по сравнению с контрольной группой (5,6 мкг/мл и 1,5 мкг/мл соответственно). В группах 2 (биовит) и 5 (рыбы, не получавшие лекарств) концентрация лизоцима увеличилась в 3 и 2,2 раза соответственно (4,5 мкг/мл и 3,3 мкг/мл). Минимальный рост (на 33%) концентрации лизоцима наблюдали в группах 3 (кормогризин) и 4 (бацилихин): 1,9 мкг/мл и 2,1 мкг/мл соответственно. Эти данные соответствуют данным электрофоретического исследования.

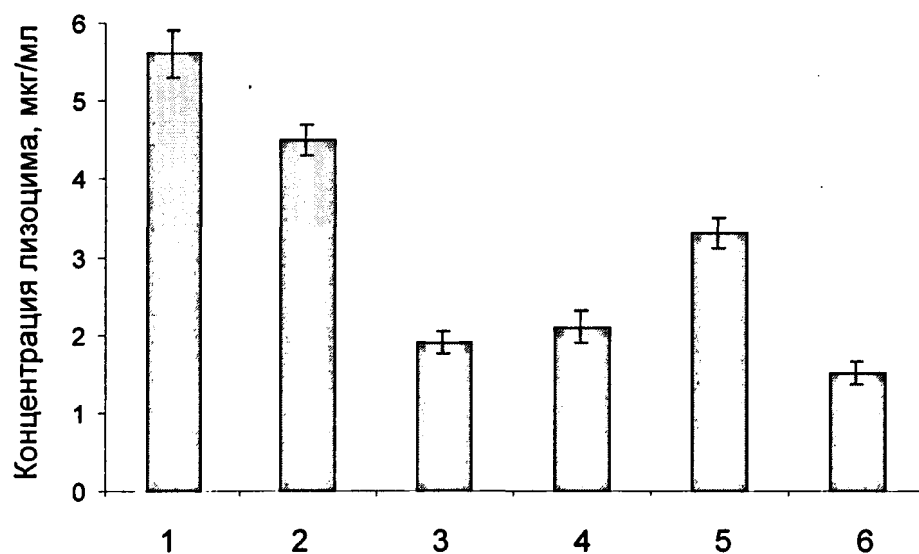


Рис. 8. Концентрация лизоцима в сыворотках крови радужной форели (1 — нифулин, 2 — биовит, 3 — кормогризин, 4 — бацилихин, 5 — нелеченые, 6 — здоровые)

Таким образом, комплексное исследование различных физиологических показателей при лечении энтерита молоди радужной форели в условиях прудового хозяйства обнаружило, что существуют достоверные изменения в клинических, патологоанатомических, бактериологических, паразитологических, гематологических и иммунологических показателях заболевших рыб, получавших и не получавших антибиотики. Леченые рыбы внешне практически здоровы, у них улучшается состояние кишечника и печени. В кишечнике леченых рыб уменьшается вплоть до нормы количество бактерий, вызвавших заболевание (*Alcaligenes sp.* и *Citrobacter freundii*). На поверхности кожи не выявляются эктопаразиты, обнаруженные у заболевших рыб до антибиотикотерапии (*Argulus sp.* и *Diplostomum sp.*). Концентрация гемоглобина у леченых рыб соответствует норме (83 г/л), тогда как у заболевших нелеченых рыб она равна 34 г/л. СОЭ также приближается к норме (7 мм/ч), у нелеченых рыб этот показатель равен 19 мм/ч. При лечении изменяется белковый состав сыворотки крови рыб, увеличивается концентрация лизоцима (1,5 мкг/мл у здоровых рыб, 3,3 мкг/мл у заболевших нелеченых рыб и 1,9–5,6 мкг/мл у леченых рыб).

Сравнение влияния различных лекарственных препаратов (нифулин, биовит-80, кормогризин-40 и бацилихин-120) продемонстрировало, что их эффективность различна. Наибольший положительный эффект при лечении энтерита рыб проявили нифулин в дозе 1 кг/т корма и биовит-80 в дозе 12,5 кг/т корма. Эти лекарственные препараты можно рекомендовать для лечения энтерита при разведении рыб в рыбных хозяйствах.



Данные, полученные разными методами исследования, полноценно отражают картину заболевания и лечения рыб. Определение активности лизоцима показало, что уровень фермента в сыворотках радужной форели увеличился более чем в 2 раза (от 1,5 до 3,3 мкг/мл), что соответствует данным литературы об активности лизоцима при бактериальных инфекциях [Fletcher & White, 1973; Grinde, 1989]. В зависимости от выбранного терапевтического агента концентрация лизоцима повышалась до 4,5–5,6 мкг/мл или понижалась до 1,9–2,1 мкг/мл.

**5.1.2. Исследование зависимости иммунологических и гематологических показателей наваги и трески Белого моря от зараженности паразитами**

Скребень *Echinorhynchus gadi* (Müller, 1776) — один из наиболее массовых видов паразитов тресковых рыб. Его жизненный цикл осуществляется со сменой хозяев (диксенный тип). На стадии половой зрелости скребень обитает в кишечнике различных видов рыб, его ларвогенез осуществляется в сублитеральных ракообразных, а во внешней среде он оказывается только на стадии яйца.

К настоящему времени известно, что дефинитивными хозяевами скребня в Белом море являются 15 видов рыб. Основным из них является треска. По данным Гиченок экстенсивность инвазии трески скребнем не бывает существенно ниже 100%, а интенсивность может достигать нескольких десятков и даже сотен экземпляров паразитов на одну особь [Гиченок, 1996]. Заметную роль в поддержании численности популяции скребня в Белом море играет также навага, однако, в отличие от трески, зараженность наваги этим паразитом существенно меньше: экстенсивность инвазии скребнем у наваги в различные годы и сезоны

колебалась в пределах 28,5–86,6% при средней интенсивности инвазии менее 10 экземпляров скребня на особь.

Паразитологические исследования рыб, обитающих в Балтийском море, показывают, что скребень поражает тресковые рыбы и в этом районе. Минимальная интенсивность заражения кишечника трески скребнем наблюдается в районе Латвии и составляет 1–5 экземпляров на рыбу при экстенсивности заражения 67%, максимальная инвазия наблюдается в районе Польши и составляет 1–112 экземпляров на рыбу при экстенсивности заражения 73% [Безгачина, 2000].

В кишечнике дефинитивного хозяина скребни интенсивно питаются, достигают половозрелого состояния и размножаются, откладывая огромное количество оплодотворенных яиц. Скребни удерживаются в полости кишечника, внедряясь в ее слизистую втяжными хоботками, снабженными многочисленными крючьями. При интенсивных инвазиях это может приводить к выраженным повреждениям слизистой оболочки кишечника и влиять на процессы пищеварения у рыб. В случаях высокой интенсивности инвазии (свыше 300 экземпляров паразита на особь) наблюдается истощение рыб, характеризующееся значительным снижением их веса [Шульман и Шульман-Альбова, 1953]. На общем состоянии организма рыб сказывается не только поглощение скребнями питательных веществ хозяина, но и воздействие на него метаболитов паразита. Паразиты чутко реагируют на любые изменения в популяциях их хозяев, и ослабление иммунитета хозяина вследствие стресса может привести к повышению интенсивности инвазии рыб.

Кроме того, при массовом заражении наиболее опасным для трески, помимо скребня, может быть также эктопаразитический веслоногий рачок *Lernaeocera*

*branchialis*, который является гематофагом [Шульман и Шульман-Альбова, 1953]. В Балтийском моря этот паразит выявляется у 2,9% трески [Безгачина, 2000]. У используемых в данной работе рыб рачок встречался в единичном количестве и не учитывался при обработке результатов.

В ходе комплексного обследования наваги и трески Белого моря определяли морфологические параметры рыб, зараженность рыб паразитами, состав бактериальной флоры жабр рыб, гематологические, биохимические и иммунологические показатели и сравнивали их в норме и при патологии. Рыбы (навага — 36 экземпляров, треска — 48 экземпляров) были разделены на группы в зависимости от интенсивности заражения скребнем *Echinorhynchus gadi* (табл. 7).

#### 5.1.2.1. Морфологические параметры рыб

В соответствии с литературой, заражаемость рыб паразитами в существенной мере зависит от размера и возраста рыб [Васильков, 1999]. Некоторые гельминтозы свойственны только определенному возрасту, что может быть связано с состоянием иммунной системы рыб, особенностями питания рыб разного возраста.

В работе оценивали морфологические параметры используемых в работе рыб для определения соответствия размеров рыб степени зараженности. Экземпляры наваги в первых трех группах не различались существенно по длине и массе (табл. 8). Расстояние от переднего конца головы до конца хвостового плавника составило в среднем 22,4 см, расстояние от переднего конца головы до конца чешуйного покрова составило в среднем 20,6 см. Средняя масса наваги первых трех групп — 92,0 г. Длина и масса наваги из группы 4 была больше: расстояние от переднего конца головы до конца хвостового плавника — 27,5 см, от

Табл. 7. Группы используемых в эксперименте наваги и трески

Группа	Количество паразитов на особь	Количество особей в группе
<i>Навага</i>		
1	0	19
2	1	13
3	2	3
4	4	1
<i>Треска</i>		
1	0-5	15
2	6-15	23
3	16-25	6
4	26-35	2
5	36-45	1
6	56-65	1

Табл. 8. Морфологические параметры наваги и трески

Группа	Количество паразитов на особь	L (см) <sup>1</sup>	l (см) <sup>2</sup>	Q (г) <sup>3</sup>
<i>Навага</i>				
1	0	22,7 ± 2,2	21,1 ± 1,8	92,1 ± 28,0
2	1	22,6 ± 2,2	21,0 ± 2,1	95,7 ± 33,1
3	2	22,0 ± 0,89	20,7 ± 0,9	75,4 ± 9,5
4	4	27,5	25,8	148,2
<i>Треска</i>				
1	0-5	21,8 ± 4,3	20,0 ± 3,9	134,4 ± 36,4
2	6-15	24,1 ± 4,2	22,8 ± 3,6	161,3 ± 51,6
3	16-25	26,7 ± 3,1	24,6 ± 2,8	202,3 ± 61,6
4	26-35	20,9 ± 1,9	19,7 ± 1,5	106,2 ± 17,8
5	36-45	24,5	22,5	137,7
6	56-65	30,2	28,1	315,0

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

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

<sup>3</sup> Масса рыбы

переднего конца головы до конца чешуйного покрова — 25,8 см; масса — 148,2 г. В группах трески расстояние от переднего конца головы до конца хвостового плавника в среднем составило 23,7 см, от переднего конца головы до конца чешуйного покрова — 21,8 см. Масса трески в среднем составила 158,4 г. Сравнение средних показателей длины и массы по группам рыб показывает, что прямой корреляции между морфологическими показателями исследуемых в данной работе рыб и их зараженностью паразитами нет, следовательно, морфологические параметры рыб можно не учитывать при дальнейшем анализе данных.

#### 5.1.2.2. Показатели зараженности рыб скребнем *Echinorhynchus gadi*

Треска и навага Белого моря являются, по данным литературы, основными дефинитивными хозяевами скребня *Echinorhynchus gadi* [Гиченок, 1996]. У использовавшихся в данной работе особей наваги доля незараженных рыб составила 47,2%, причем средняя интенсивность инвазии у зараженных рыб составила 1,4 паразита на особь (табл. 9). Средняя удельная интенсивность инвазии — 0,01 паразита на 1 г тела особи хозяина. В случае трески доля незараженных рыб составила всего 2,1%. Средняя интенсивность инвазии у зараженных рыб составила 11,7 паразита на особь, средняя удельная интенсивность инвазии — 0,07 паразита на 1 г тела особи хозяина. Таким образом, по сравнению с треской навага мало заражена паразитом (экстенсивность инвазии у наваги почти в 2 раза меньше, интенсивность инвазии — в 8 раз меньше, а удельная интенсивность инвазии — в 7 раз меньше, чем у трески). Группу 1 наваги (незараженные особи) можно считать контролем для других групп рыб.

Табл. 9. Показатели зараженности наваги и трески скребнем *Echinorhynchus gadi*

Группа	Экстенсивность инвазии <sup>1</sup>	Интенсивность инвазии <sup>2</sup>	Средняя интенсивность инвазии	Средняя удельная интенсивность инвазии <sup>3</sup>
Навага				
1	52,8%	0	0	0
2		1	1	0,01
3		2	2	0,02
4		4	4	0,03
Треска				
1	97,9%	0-5	2,9	0,02
2		6-15	10,4	0,07
3		16-25	18,8	0,09
4		26-35	26,5	0,25
5		36-45	36,0	0,26
6		56-65	65,0	0,21

<sup>1</sup> Приведена для данной выборки

<sup>2</sup> Количество паразитов на особь

<sup>3</sup> Количество паразитов на 1 г тела особи хозяина

### 5.1.2.3. Бактериологический анализ

Проводили бактериологический анализ первичных и вторичных смывов с жаберных лепестков наваги и трески. Большинство выделенных с жаберных лепестков рыб колоний бактерий бледно-желтого цвета или бесцветные. Яркоокрашенных колоний не обнаружено. Морфологически это короткие палочки, реже встречаются длинные подвижные палочки и кокки. Все выделенные бактерии оксидазоположительные.

С жаберных лепестков наваги и трески выделили три культуры бактерий. Бактерии с жабр наваги отнесены к группе *Corynebacteria sp.*, а с жабр трески — к группам *Bacillus sp.* и *Pseudomonas sp.*

### 5.1.2.4. Изучение гематологических показателей

Из литературы известно, что морфологический состав крови рыб, и количественный и качественный, существенно варьирует и зависит от условий среды обитания [Калашникова, 1976; Roubal, 1986; Dethloff et al., 2001]. То же можно сказать и о концентрации гемоглобина в крови рыб [Солдатов, 1988; Dethloff et al., 2001]. Калашникова отмечает: «У рыб наряду с некоторыми «примитивными» чертами морфологии клеток крови (наличие ядра в эритроцитах и тромбоцитах, пониженное содержание гемоглобина в эритроцитах, меньший объем форменных элементов крови и др.)... существуют черты, показывающие высокое соответствие (приспособленность) к условиям водной среды. К таким чертам относятся: специфика лейкоцитов, их большое число в крови и резко меняющийся состав, множественные и взаимозаменяемые очаги кроветворения» [Калашникова, 1976].



В данной работе проводили исследование зависимости морфологического состава крови рыб (концентрации эритроцитов и лейкоцитов) от зараженности скребнем *Echinorhynchus gadi*. Также оценивали изменение биохимических параметров крови (СОЭ, концентрации гемоглобина, цветного показателя крови).

Гематологические показатели наваги и трески зависели от степени зараженности паразитом. У наваги с повышением интенсивности инвазии наблюдали снижение концентрации эритроцитов в крови (табл. 10): у незараженных рыб (группа 1) концентрация эритроцитов составила  $1,90 \pm 0,08$  млрд/мл, у зараженных рыб этот показатель уменьшился до  $1,74 \pm 0,09$  млрд/мл (группа 2);  $1,58 \pm 0,07$  млрд/мл (группа 3) и  $1,30$  млрд/мл (группа 4). Таким образом, у максимально зараженной наваги концентрация эритроцитов уменьшилась на 30%. Концентрация эритроцитов в крови трески составила  $1,40 \pm 0,09$  млрд/мл (группа 1);  $1,46 \pm 0,04$  млрд/мл (группа 2);  $1,24 \pm 0,06$  млрд/мл (группа 3);  $0,77 \pm 0,07$  млрд/мл (группа 4);  $1,01$  млрд/мл (группа 5) и  $0,98$  млрд/мл (группа 6). Общее снижение концентрации эритроцитов составило 45%. Следовательно, степень уменьшения концентрации эритроцитов у зараженных рыб в случае трески была в полтора раза выше.

Ту же картину наблюдали и при подсчете концентрации лейкоцитов в крови рыб (табл. 10). Концентрация лейкоцитов у незараженных особей наваги (группа 1) составила  $5,20 \pm 0,11$  млн/мл. У зараженных рыб она была ниже —  $4,94 \pm 0,21$  млн/мл (группа 2);  $3,61 \pm 0,12$  млн/мл (группа 3) и  $3,20$  млн/мл (группа 4). Снижение показателя составило около 40%. Концентрация лейкоцитов в крови трески составила  $8,17 \pm 0,19$  млн/мл (группа 1);  $11,06 \pm 0,51$  млн/мл (группа 2);

Табл. 10. Морфологический состав крови наваги и трески

Группа	Количество паразитов на особь	Концентрация	
		Эритроцитов (млрд/мл)	Лейкоцитов (млн/мл)
Навага			
1	0	1,90 ± 0,08	5,20 ± 0,11
2	1	1,74 ± 0,09	4,94 ± 0,21
3	2	1,58 ± 0,07	3,61 ± 0,12
4	4	1,30	3,20
Треска			
1	0-5	1,40 ± 0,09	8,17 ± 0,19
2	6-15	1,46 ± 0,04	11,06 ± 0,51
3	16-25	1,24 ± 0,06	10,27 ± 0,32
4	26-35	0,77 ± 0,07	8,20 ± 0,12
5	36-45	1,01	6,41
6	56-65	0,98	6,35

10,27±0,32 млн/мл (группа 3); 8,20±0,12 млн/мл (группа 4), 6,41 млн/мл (группа 5) и 6,35 млн/мл (группа 6). Общее снижение концентрации лейкоцитов составило также около 40%.

Полученные данные свидетельствуют, что с ростом степени зараженности наваги и трески уменьшается уровень содержания форменных элементов в крови рыб. Тому могут быть следующие объяснения: во-первых, у зараженных рыб может быть подавлен гемопоэз в некоторых очагах кроветворения; во-вторых, эритроциты и лейкоциты могут разрушаться в процессе дифференцировки или уже на стадии функциональной зрелости; наконец, могут происходить нарушения циркуляции клеток крови. Хотя скребни живут в кишечнике, который у рыб не является органом кроветворения, они могут поглощать необходимые для нормального функционирования организма рыб элементы и, в свою очередь, выделять токсические вещества, нарушающие физиологические механизмы в организме рыб. Литературных данных, которые могли бы подтвердить предложенные объяснения или предоставить иные, пока нет.

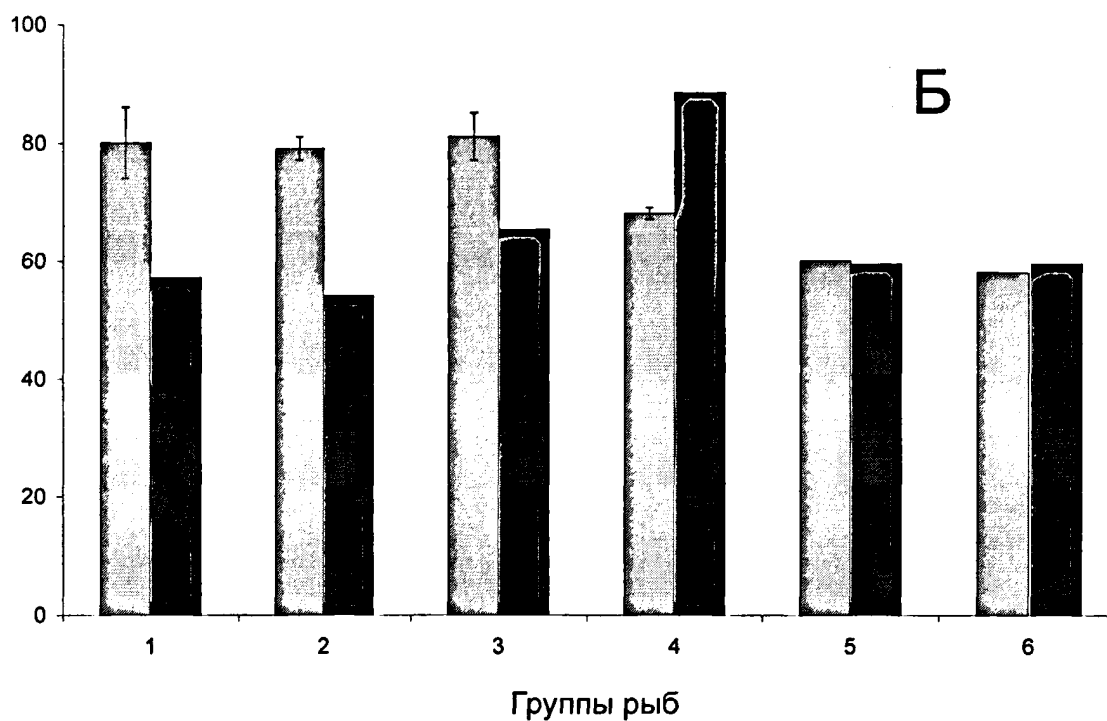
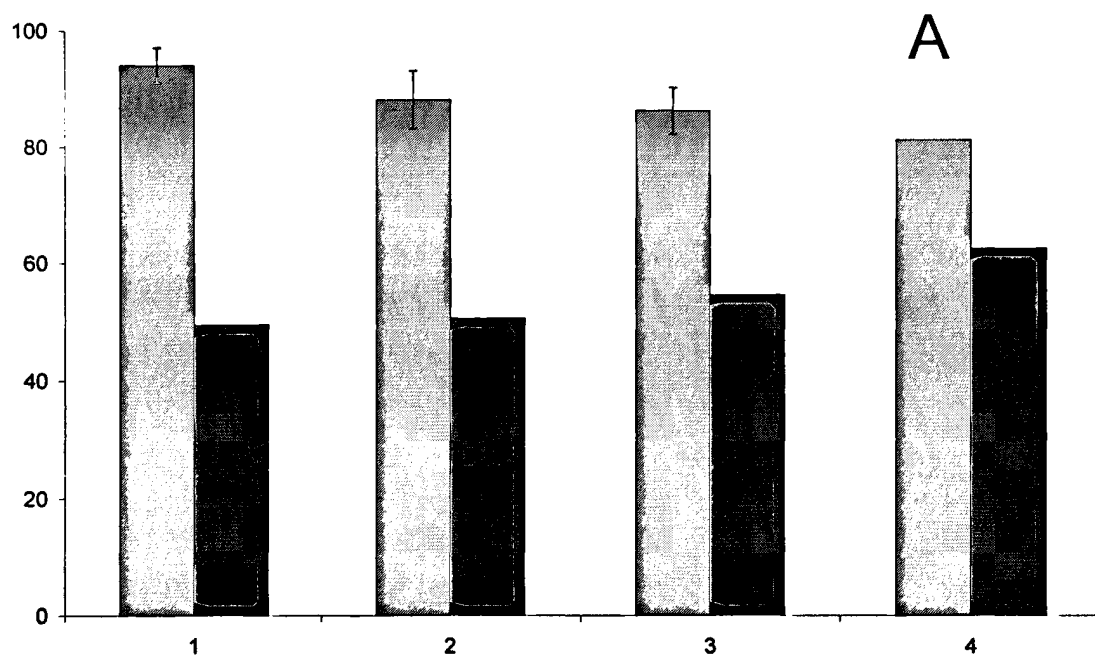
СОЭ наваги и трески достоверно не изменялась при возрастании зараженности рыб паразитами (табл. 11). СОЭ и у наваги, и у трески была низкой и составила около 2,5–3 мм/ч. У максимально зараженных рыб (группа 4 наваги и группа 6 трески) СОЭ составила 2 мм/ч. В литературе отсутствуют данные об изменении СОЭ при инвазиях у рыб.

Концентрация гемоглобина у наваги изменялась мало (рис. 9). У наваги группы 1 (незараженные рыбы) она составила 94±3 г/л, у наваги группы 2 — 88±5 г/л; группы 3 — 86±4 г/л; группы 4 — 81 г/л. Различия данных достоверны, но

Табл. 11. Биохимические и иммунохимические параметры крови наваги и

трески

Группа	Количество паразитов на особь	СОЭ (мм/ч)	Концентрация белка (г/л)	Концентрация лизоцима (мкг/мл)
<i>Навага</i>				
1	0	$2,5 \pm 0,5$	$40,3 \pm 2,1$	$0,51 \pm 0,05$
2	1	$3,0 \pm 0,3$	$45,5 \pm 1,7$	$2,34 \pm 0,13$
3	2	$2,5 \pm 0,4$	$52,4 \pm 0,9$	$2,72 \pm 0,17$
4	4	2,0	60,8	2,53
<i>Треска</i>				
1	0-5	$2,5 \pm 0,2$	$35,5 \pm 1,9$	$1,03 \pm 0,07$
2	6-15	$2,8 \pm 0,3$	$37,0 \pm 3,1$	$1,29 \pm 0,10$
3	16-25	$2,5 \pm 0,1$	$42,7 \pm 2,4$	$1,74 \pm 0,05$
4	26-35	$2,5 \pm 0,3$	$52,9 \pm 1,7$	$1,98 \pm 0,15$
5	36-45	2,5	59,7	2,03
6	56-65	2,0	68,3	1,51



■ Концентрация гемоглобина, г/л

■ Цветной показатель крови, пг гемоглобина на эритроцит

Рис. 9. Концентрация гемоглобина и цветной показатель крови: А — навага, Б — треска

разница между показателями групп 1 и 4 составляет всего 13,8%. У трески концентрация гемоглобина уменьшилась от  $80 \pm 6$  г/л (группа 1) до 58 г/л (группа 6). В группах 2 и 3 концентрация гемоглобина была близка показателю группы 1 ( $79 \pm 2$  г/л и  $81 \pm 4$  г/л), тогда как в группах 4 и 5 она была ниже ( $68 \pm 1$  г/л и 60 г/л). Общее уменьшение концентрации гемоглобина составило 27,5%.

Цветной показатель крови, отражающий насыщенность эритроцитов гемоглобином, у наваги практически не изменялся (группа 1 — 49,5 пг гемоглобина на эритроцит, группа 2 — 51,1 пг гемоглобина на эритроцит, группа 3 — 54,4 пг гемоглобина на эритроцит, группа 4 — 62,3 пг гемоглобина на эритроцит). У трески наблюдали такую же зависимость (группа 1 — 57,1 пг гемоглобина на эритроцит, группа 2 — 54,1 пг гемоглобина на эритроцит, группа 3 — 65,3 пг гемоглобина на эритроцит, группа 5 — 59,4 пг гемоглобина на эритроцит, группа 6 — 59,1 пг гемоглобина на эритроцит). В группе 4 цветной показатель был высоким и составил 88,3 пг гемоглобина на эритроцит. Это связано с низким уровнем эритроцитов в крови рыб этой группы. Таким образом, уменьшение концентрации эритроцитов в крови рыб и снижение содержания гемоглобина происходит на фоне не изменяющейся существенно насыщенности эритроцитов гемоглобином (рис. 9).

#### *5.1.2.5. Определение концентрации белка в сыворотках рыб*

Из литературы известно, что концентрация белка в сыворотке крови атлантической трески составляет около 40 мг/мл [Magnadottir et al., 1999a; 1999b]. Повышение температуры среды обитания рыб приводит к снижению уровня белка, а улучшение питания — к повышению. Концентрация белка в сыворотке крови также зависит от размера: уровень белка возрастает с увеличением размеров рыб.

Кроме того, на содержание белка оказывают влияние стрессы и инфекция [Moyner et al., 1993; Rehulka, 1993; Melingen et al., 1995]. Однако данных о соотношении общей концентрации белка в сыворотке крови рыб со степенью зараженности рыб паразитами в литературе нет.

Исследование концентрации белка в сыворотке крови беломорской наваги и трески выявило, что у наваги и трески уровень белка в сыворотке крови достоверно значительно увеличивался с повышением зараженности рыб (табл. 11). У незараженной наваги (группа 1) концентрация белка в сыворотке составила  $40,3 \pm 2,1$  мг/мл. У зараженных особей этот показатель был равен  $45,5 \pm 1,7$  мг/мл (группа 2);  $52,4 \pm 0,9$  мг/мл (группа 3) и  $60,8$  мг/мл (группа 4). Общее повышение концентрации белка у наваги составило 50%. У трески, минимально зараженной скребнем (группа 1), концентрация белка в сыворотке была равна  $35,5 \pm 1,9$  мг/мл. У трески группы 2 —  $37,0 \pm 3,1$  мг/мл; группы 3 —  $42,7 \pm 2,4$  мг/мл; группы 4 —  $52,9 \pm 1,7$  мг/мл; группы 5 —  $59,7$  мг/мл и группы 6 —  $68,3$  мг/мл. Общее повышение концентрации белка у трески составило 92%.

Таким образом, паразитарная инвазия вызвала рост концентрации белка в сыворотке зараженных рыб. Это явление может быть связано, во-первых, с увеличением концентрации некоторых сывороточных белков рыб и появлением в сыворотке новых белков, а во-вторых — с выделением в кровотоки хозяина веществ, продуцируемых паразитом. По данным литературы, при инфекционных воздействиях и стрессах рост концентрации белка в сыворотке рыб обуславливается, прежде всего, альбумином и иммуноглобулинами, а также другими сывороточными белками [Moyner et al., 1993; Rehulka, 1993; Melingen et al.,

1995]. В данной работе было сделано предположение, что одной из фракций, вносящих вклад в увеличение общей концентрации белка в сыворотке, может быть лизоцим, поскольку, как уже обсуждалось, замечено повышение его активности при различных внешних воздействиях на организм рыб.

#### *5.1.2.6. Сравнение электрофореграмм сывороток рыб*

При исследовании сывороток рыб методом электрофореза было показано, что при заражении рыб паразитами в сыворотке крови появились новые белковые фракции (рис. 10 и 11). Вероятно, эти фракции внесли значительный вклад в увеличение концентрации белка в сыворотках рыб. Фракция с молекулярной массой около 14–15 кДа, соответствующая лизоциму, более выражена у рыб с высокой степенью зараженности. На профиле оптической плотности белковых полос пики, соответствующие этой фракции, выше.

#### *5.1.2.7. Определение концентрации лизоцима в сыворотках рыб*

По данным некоторых исследований в сыворотке крови атлантической трески активность лизоцима очень низка или вообще отсутствует [Magnadottir et al., 1999a; 1999b]. Определение концентрации лизоцима по методу Лабинской у наваги и трески Белого моря показало, что концентрация лизоцима в сыворотке крови исследованных рыб составляла около 2 мкг/мл (табл. 11). У незараженной наваги (группа 1) концентрация лизоцима в сыворотке была самой низкой ( $0,51 \pm 0,05$  мкг/мл). У зараженных рыб концентрация лизоцима была в среднем в 5 раз выше (группа 2 —  $2,34 \pm 0,13$  мкг/мл; группа 3 —  $2,72 \pm 0,17$  мкг/мл и группа 4 — 2,53 мкг/мл). У минимально зараженной паразитами трески (группа 1) концентрация лизоцима составила  $1,03 \pm 0,07$  мкг/мл. По мере роста степени



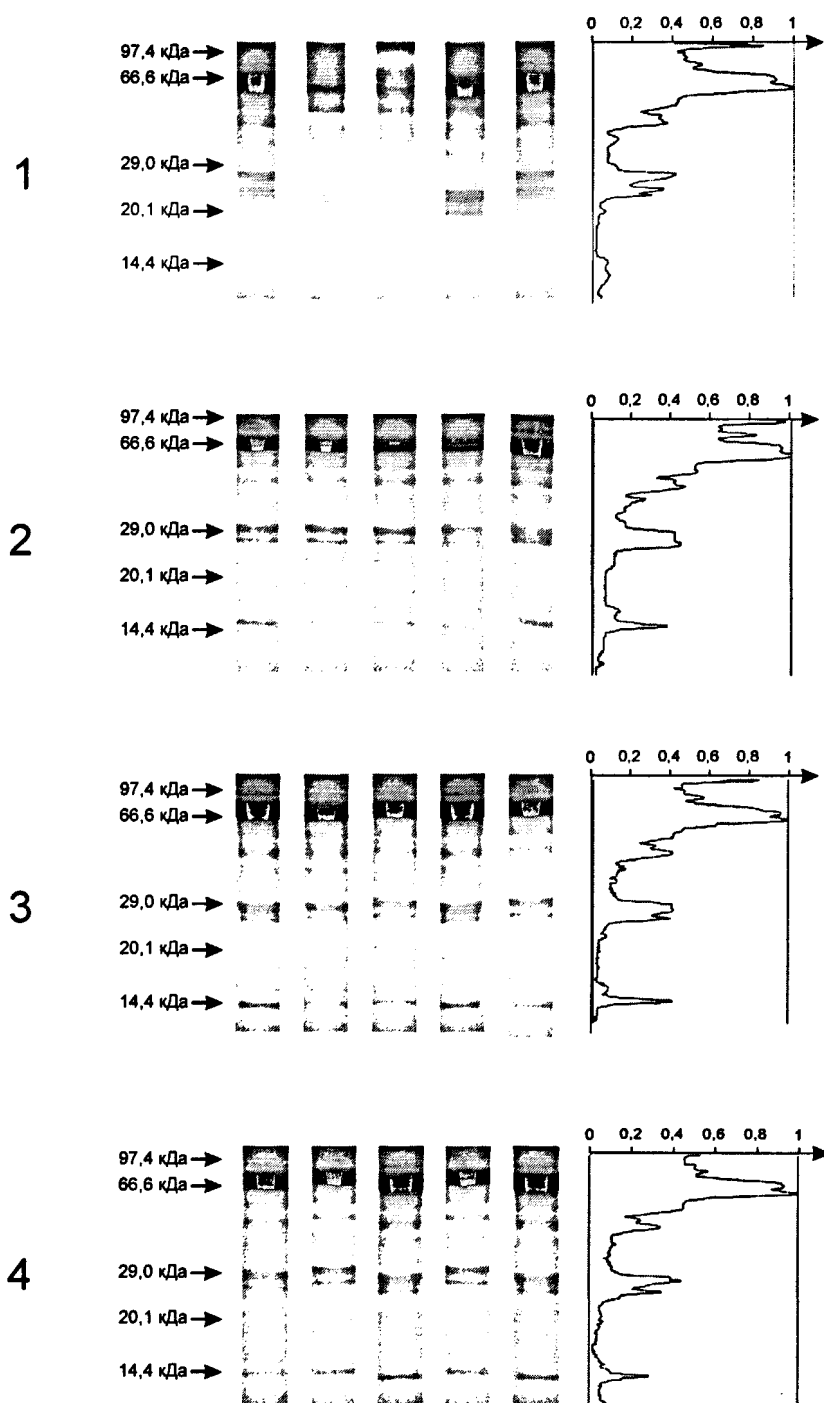


Рис. 10. Двуступенчатый электрофорез сывороток крови наваги в ПААГ, содержащем ДСН, в восстанавливающих условиях. Слева: группы рыб; стрелками указана молекулярная масса. Справа: усредненный для группы профиль оптической плотности электрофореграммы (по оси ординат указана относительная оптическая плотность)

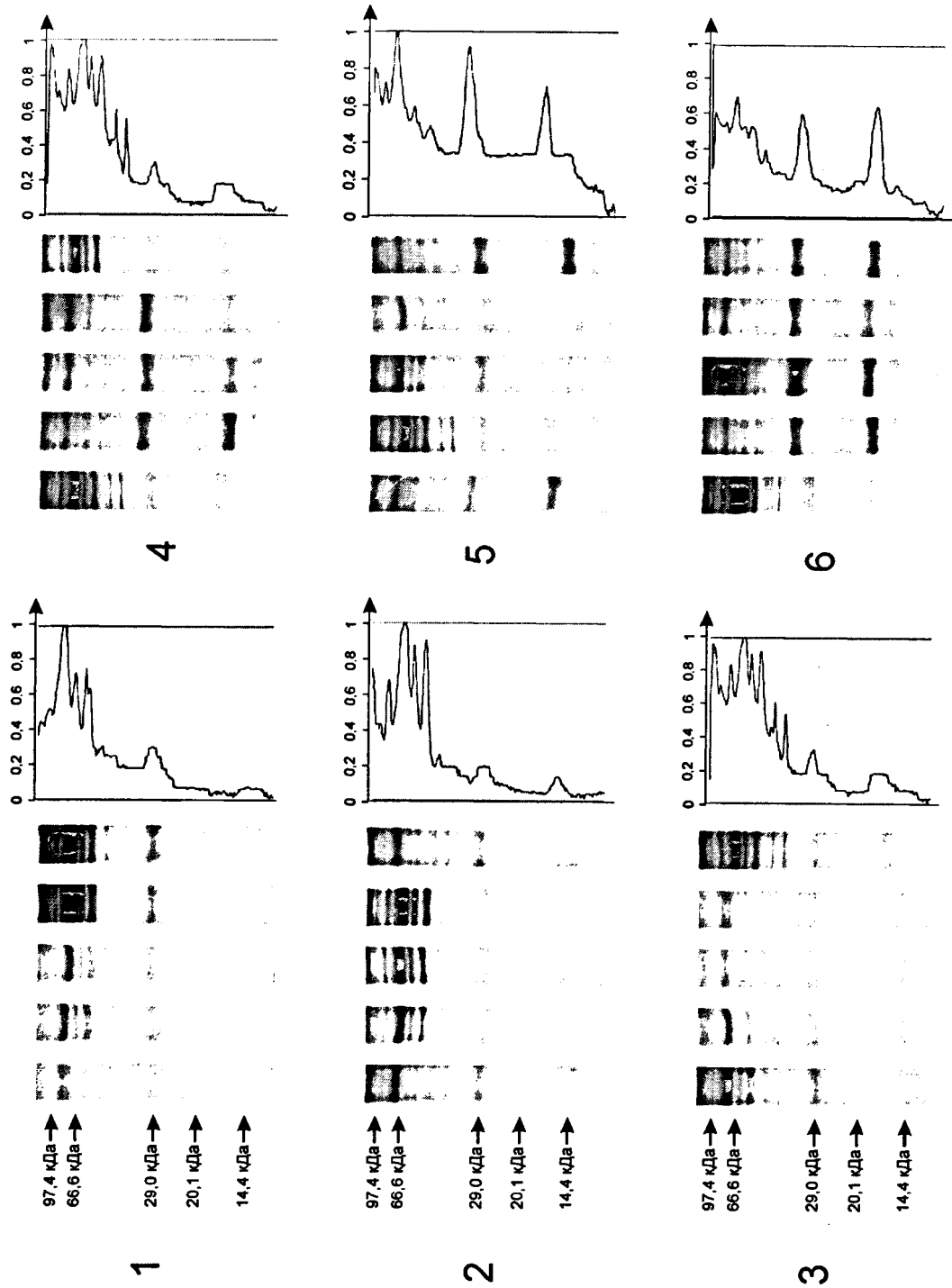


Рис.11. Двуступенчатый электрофорез сывороток крови трески в ПААГ, содержащем ДСН, в восстанавливающих условиях. Слева: группы рыб; стрелками указана молекулярная масса. Справа: усредненный для группы профиль оптической плотности электрофореграммы (по оси ординат указана относительная оптическая плотность)

зараженности концентрация лизоцима в сыворотке рыб достоверно увеличивалась: группа 2 —  $1,29 \pm 0,10$  мкг/мл; группа 3 —  $1,74 \pm 0,05$  мкг/мл; группа 4 —  $1,98 \pm 0,15$  мкг/мл; группа 5 —  $2,03$  мкг/мл и группа 6 —  $1,51$  мкг/мл. Концентрация лизоцима в сыворотке трески возросла в 2 раза.

Таким образом, в работе было показано, что в сыворотке крови тресковых рыб Белого моря присутствует активный лизоцим, и была выявлена зависимость концентрации фермента от зараженности рыб скребнем *Echinorhynchus gadi*. Минимальную концентрацию фермента наблюдали у незараженной наваги, тогда как у зараженных рыб паразитом рыб уровень белка был в 5 раз выше. По сравнению с незараженной навагой концентрация лизоцима в сыворотках крови трески была выше в 2–4 раза, но в пределах групп трески уровень белка изменился только в 2 раза. Поскольку данные литературы о корреляции степени паразитарной инвазии и содержанием фермента отсутствуют, можно сделать только предположения о том, каковы механизмы, регулирующие уровень лизоцима в сыворотке зараженных паразитами рыб. Возможно, у наваги быстрое и сильное увеличение лизоцима при заражении является следствием активации врожденных механизмов гуморального иммунитета, тогда как у трески, характеризующейся практически стопроцентной зараженностью, эти механизмы уже активированы и постоянно поддерживаются в действующем состоянии.

Следовательно, данные исследования показывают, что у зараженных паразитами рыб в естественных условиях обитания изменяются показатели врожденного гуморального иммунитета: на электрофореграмме появляются новые фракции белка, в том числе низкомолекулярная фракция с кажущейся молекулярной

массой, соответствующей лизоциму, растет общая концентрация белка в сыворотке крови и концентрация лизоцима. Как уже обсуждалось выше, лизоцим помимо широко известной гликозидазной активности, субстратом для которой являются компоненты клеточной стенки бактерий, обладает и другими, не связанными с ферментативной активностью и не изученными в полной мере свойствами. Обнаруженный в данной работе рост концентрации лизоцима в соответствии с увеличением степени зараженности наваги и трески скребнем *Echinorhynchus gadi* можно объяснить следующим.

Во-первых, любая биологическая агрессия стимулирует у рыб одновременное развитие различных форм неспецифического иммунного ответа, который проявляется в том числе и в увеличении концентрации лизоцима в сыворотках крови рыб. Однако если считать, что основная роль лизоцима в организме — борьба с микробной инфекцией, то в случае паразитарной инвазии эта реакция оказывается напрасной.

Из литературы известно, что заболевание паразитами может, с одной стороны, повысить риск вторичной инфекции рыб и спровоцировать развитие заболеваний смешанного типа, а с другой стороны — активировать иммунные реакции [Васильков, 1999; Johansen & Sommer, 2001]. Роль лизоцима оказывается превентивной, направленной на возможное предотвращение вторичной инфекции.

В-третьих, лизоцим может обладать и неизвестными в настоящее время свойствами, эффективными в борьбе с паразитами. В таком случае активация лизоцима позволяет рыбам повысить общую сопротивляемость организма инвазии.

Можно сделать заключение, что комплексное обследование иммунологических, гематологических и бактериологических показателей наваги и трески Белого моря, зараженных скребнем *Echinorhynchus gadi*, показало, что изменение этих показателей у рыб зависит от степени зараженности рыб паразитом. Исследованные рыбы являются основными дефинитивными хозяевами паразита, но экстенсивность инвазии у трески составила 97,9% при средней интенсивности инвазии 11,7 паразита на особь, а у наваги — соответственно 52,8% и 1,4 паразита на особь. При анализе данных было выявлено, что интенсивность инвазии не зависит от длины и веса рыб. Это учитывали при дальнейшей обработке данных.

Показано, что у зараженных рыб уменьшается содержание в крови форменных элементов — эритроцитов и лейкоцитов, ответственных за иммунные реакции. Уменьшение концентрации эритроцитов составило 30% у наваги (от 1,90 до 1,30 млрд/мл) и 45% у трески (от 1,40 до 0,77 млрд/мл); снижение концентрации лейкоцитов — около 40% в обоих случаях (от 5,20 до 3,20 млн/мл у наваги и от 11,06 до 6,35 млн/мл у трески). При этом было зарегистрировано одновременное уменьшение, хотя и небольшое, концентрации в крови гемоглобина: на 13,8% у наваги (от 94 до 81 г/л) и на 27,5% у трески (от 80 до 58 г/л). Цветной показатель крови достоверно не варьировал. СОЭ незараженных и зараженных рыб не изменялась и находилась на уровне 2,5–3 мм/ч, но у наиболее зараженных рыб она уменьшилась до 2 мм/ч.

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

При исследовании врожденного гуморального иммунитета наваги и трески было показано, что в сыворотке крови зараженных рыб существенно увеличилась концентрация белка: на 50% у наваги (от 40,3 мг/мл до 60,8 мг/мл) и почти вдвое у трески (от 35,5 мг/мл до 68,3 мг/мл). В сыворотке появились новые фракции белка и возросло содержание лизоцима: в 5 раз у наваги (от 0,51 до 2,72 мкг/мл) и в 2 раза у трески (от 1,03 до 2,03 мкг/мл).

Таким образом, сравнение комплексных данных, полученных при изучении инфицированных бактериями рыб в экспериментальных условиях (радужная форель) и зараженных паразитами рыб в естественных условиях обитания (навага и треска), показало, что факторы врожденного иммунитета, в частности лизоцим, являются надежными и достоверными показателями состояния рыб при различном внешнем воздействии. Нарушение целостности внутренней среды организма рыб вследствие внешней агрессии стимулирует повышение концентрации белка, лизоцима в сыворотке крови рыб и появление новых белков. Отклонение этих показателей от нормы свидетельствует о патологическом состоянии животных. Повышение концентрации лизоцима при паразитарной инвазии позволяет предположить существование новых, неизученных свойств этого белка.

## **5.2. Исследование специфического иммунитета радужной форели**

Из литературы известно, что у рыб, как и у высших позвоночных, специфические иммунные реакции осуществляются посредством антител [Shelton & Smith, 1970; Marchalonis, 1971; Marchalonis et al., 1992; Smith et al., 1993], которые

могут участвовать в борьбе организма рыб с инфекцией [Lillehaug A. 1989a; 1989b; Hastings & Ellis, 1990; Karunasagar et al., 1991; Kitao et al., 1991; Sin et al., 1994; Melingen et al., 1995; Steine et al., 2001]. Но данные о роли антител в иммунном ответе у рыб противоречивы. Во-первых, показано, что антитела разных видов костистых рыб обладают неодинаковыми биохимическими и физиологическими свойствами [Acton et al., 1971; 1972; van Ginkel et al., 1991; Glynn & Pulsford, 1993; Magnadottir, 1998]. Во-вторых, у здоровых рыб концентрация антител в сильной мере зависит от вида, возраста, размера рыб, внешних воздействий [Sanchez et al., 1993; Estevez et al., 1995; Melingen et al., 1995; Magnadottir, 1999a; 1999b; Scapigliati et al., 1999b]. В-третьих, есть данные об отсутствии у рыб иммунных реакций, свойственных антигенраспознающей системе млекопитающих: например, в некоторых случаях показано отсутствие синтеза специфических антител при иммунном ответе у рыб [Magnadottir et al., 2001] и отсутствие выраженного вторичного иммунного ответа и иммунологической памяти у рыб [Lamers et al., 1985].

В данной работе была экспериментально разработана тест-система на основе метода твердофазного иммуноферментного анализа, позволяющая определить наличие специфических антител в сыворотках рыб к бактериям *Alcaligenes sp.* и *Citrobacter freundii* и диагностировать заболевание. Эта тест-система была апробирована на рыбах, заболевших типичной инфекционной болезнью (энтеритом).

**5.2.1. Оптимизация метода твердофазного иммуноферментного анализа и экспериментальная разработка тест-системы для изучения специфического взаимодействия сывороток рыб с возбудителями заболеваний**

Диагностика заболеваний рыб на основе выявления специфической иммунореактивности организма на возбудителей проводится с помощью поликлональных и моноклональных антисывороток к антителам рыб. Например, в России создана агглютинирующая сыворотка для диагностики болезни лососевых рыб, вызываемой бактериями *Vibrio salmonicida*, которая позволяет в течение суток идентифицировать возбудителя [Безгачина и др., 1995]. Метод твердофазного ИФА, разработанный в начале 1970-х годов, служит для выявления и количественного определения антигенов и антител и является универсальным, надежным и простым в применении. В основе метода лежит использование антигенов или антител, меченых ферментами. Образовавшиеся иммунные комплексы, сорбированные на твердой фазе (например на полистироле), выявляются в результате реакции фермента с хромогенным субстратом. Высокая чувствительность и специфичность метода позволяет диагностировать даже не проявляющихся клинически заболеваний, а методическая простота и потребность в минимальном наборе оборудования позволяет проводить в полевых условиях скрининг большого количества образцов. Поскольку для проведения анализа требуется всего несколько микролитров биологического материала, диагностирование заболеваний рыб с помощью твердофазного ИФА можно проводить прижизненно. Перспективными являются разработка и создание тест-систем на основе твердофазного ИФА для

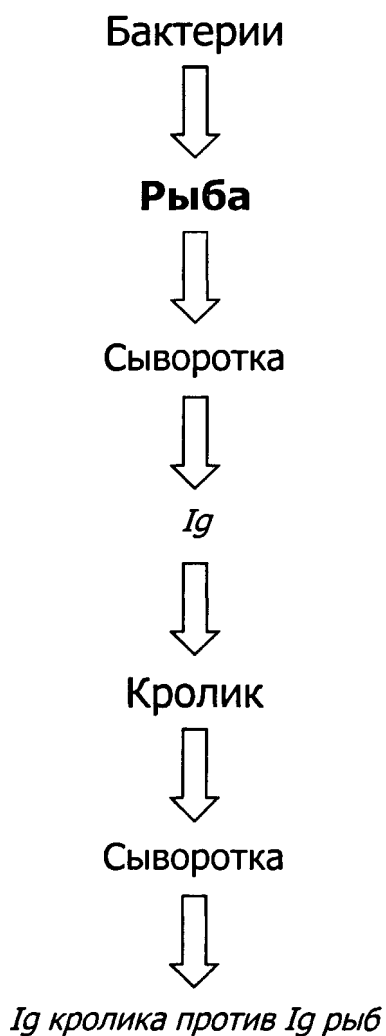


использования таких систем при диагностике заболеваний рыб в естественных условиях и аквакультурах.

Для экспериментальной разработки тест-системы на основе твердофазного ИФА для изучения специфического взаимодействия сывороток рыб с возбудителями заболеваний на подготовительном этапе выделили иммуноглобулины из сыворотки рыб, получили поликлональную антисыворотку кролика к иммуноглобулинам рыб, провели ее тестирование и выделили из нее иммуноглобулины (рис. 12), получили неразрушенные и разрушенные бактериальные клетки для использования их в качестве антигена. На следующем этапе подобрали оптимальные условия проведения твердофазного ИФА.

#### *5.2.1.1. Выделение иммуноглобулинов из сыворотки рыб*

В работе использовали сыворотку радужной форели. По данным литературы, лососевые обладают, как и другие костистые рыбы, иммуноглобулинами класса М с молекулярной массой около 760 кДа, состоящими из четырех субъединиц с молекулярной массой около 190 кДа. Молекулярная масса тяжелой и легкой цепей составляет соответственно 70 и 25 кДа. Концентрация IgM в сыворотке лососевых рыб равна 1–2 мг/мл [Voss et al., 1980; Kobayashi et al., 1982; Hordvik et al., 1992]. Выделение иммуноглобулинов из сыворотки рыб, описанное в литературе, обычно включает осаждение фракции иммуноглобулинов насыщенным раствором сульфата аммония и дальнейшую очистку методами гель-фильтрации и ионообменной хроматографии [Voss et al., 1980; Kobayashi et al., 1985; Magnadottir, 1990]. Такая очистка позволяет получить фракцию иммуноглобулинов, свободную от сывороточного альбумина, протеаз и белков системы комплемента. При выделении



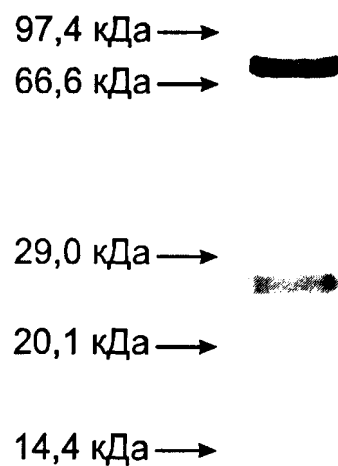
**Рис. 12.** Схема получения поликлональных кроличьих антител к иммуноглобулинам рыб. В ответ на бактериальную инфекцию в организме рыб вырабатываются специфические антитела (иммуноглобулины). После выделения этих антител из сыворотки рыб и очистки ими иммунизируют кролика. В организме кролика образуются антитела (иммуноглобулины), направленные к иммуноглобулинам рыб. После выделения и очистки кроличьих антител к иммуноглобулинам рыб их используют в ИФА

иммуноглобулинов из сыворотки радужной форели была получена фракция, чистая по данным электрофореза в ПААГ (рис. 13) для использования при иммунизации. Количество белка составило около 350 мкг на 1 мл исходной сыворотки.

*5.2.1.2. Получение поликлональной антисыворотки и поликлональных антител кролика к иммуноглобулинам рыб*

При определении иммуноглобулинов рыб используют поликлональные и моноклональные антитела [Sanchez & Dominguez, 1991; Magnadottir & Gudmundsdottir, 1992; Marchalonis et al., 1992; Sanchez et al., 1993; Scapigliati et al., 1999a]. Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью и высокой аффинностью по сравнению с поликлональными антителами, однако ограниченность специфичности, большая стоимость и сложность получения суживают спектр использования таких антител. Поликлональные антитела традиционно получают путем иммунизации обычных лабораторных животных, например кролика, однако некоторые исследователи считают этот метод неэффективным. Так, Magnadottir [Magnadottir, 1999] считает, что на получение поликлональных антител требуется большое количество белка, титр этих антител невысок ( $2-3 \times 10^3$ ) и антисыворотка дает высокие значения фоновой реакции (0,4–0,8). Другой способ получения поликлональных антител — в асцитах мыши. Такие антитела характеризуются высоким титром (более  $2,5 \times 10^5$ ), моноспецифичностью и низким уровнем фоновой реакции [Magnadottir, 1999].

В данной работе в соответствии с используемой схемой иммунизации поликлональная антисыворотка была получена в результате введения кролику около 1,5 мг иммуноглобулинов рыб, что соответствует 4 мл сыворотки рыб.



**Рис. 13.** Двуступенчатый электрофорез в полиакриламидном геле, содержащем додецил-сульфат натрия, в восстанавливающих условиях для анализа очищенных иммуноглобулинов радужной форели. Слева: молекулярная масса

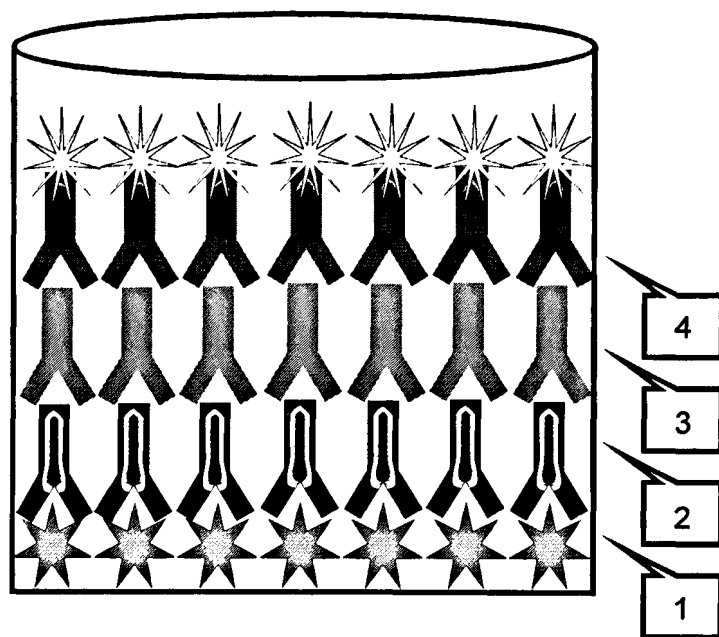
Поликлональная антисыворотка кролика к иммуноглобулинам рыб обладала высоким титром (более  $1,5 \times 10^5$ ). При тестировании антисыворотки методом твердофазного ИФА (рис. 15) значения оптической плотности в лунках, содержащих антисыворотку, при разведении более чем в  $3 \times 10^4$  раза превышали в 2 раза значения оптической плотности в лунках, содержащих контрольные антигены (БСА и иммуноглобулины мыши). Фоновая реакция антисыворотки также оказалась на низком уровне (0,1–0,2). Использование для иммунизации крупного долгоживущего лабораторного животного позволило получать антисыворотку в больших количествах. Из антисыворотки выделили иммуноглобулины и использовали их для дальнейшей работы.

#### *5.2.1.3. Подбор условий для проведения твердофазного ИФА*

При оптимизации метода твердофазного ИФА и подборе условий применительно к изучению иммунных реакций у рыб добивались, с одной стороны, наибольшей чувствительности метода, а с другой стороны — его простоты для быстрой обработки большого количества образцов. На рис. 14 показана схема проведения варианта ИФА, выбранного для применения в тест-системе.

Поскольку для исследования бралась нативная сыворотка рыб, на каждом этапе блокировали неспецифическое связывание с помощью БСА и использовали твин 80 при отмывании панелей.

Оптимальное разведение меченых пероксидазой хрена антител осла к иммуноглобулинам кролика выбирали, исходя из условий минимальной фоновой реакции и наибольшей оптической плотности. Для работы выбрано разведение



**Рис. 14.** Схема непрямого твердофазного ИФА. На твердой фазе (в полистирольных лунках 96-луночных планшетов) адсорбируются антигены — неразрушенные или разрушенные клетки бактерий (1). Специфические антитела из сывороток рыб (2) образуют с бактериальными антигенами иммунные комплексы, с которыми взаимодействуют поликлональные кроличьи антитела к иммуноглобулинам рыб (3). С кроличьими иммуноглобулинами связывается конъюгат — меченые ферментом (пероксидазой хрена) антитела осла к иммуноглобулинам кролика (4). Фермент окрашивает субстрат (ОФД), что выражается в повышении оптической плотности в лунках, содержащих фермент

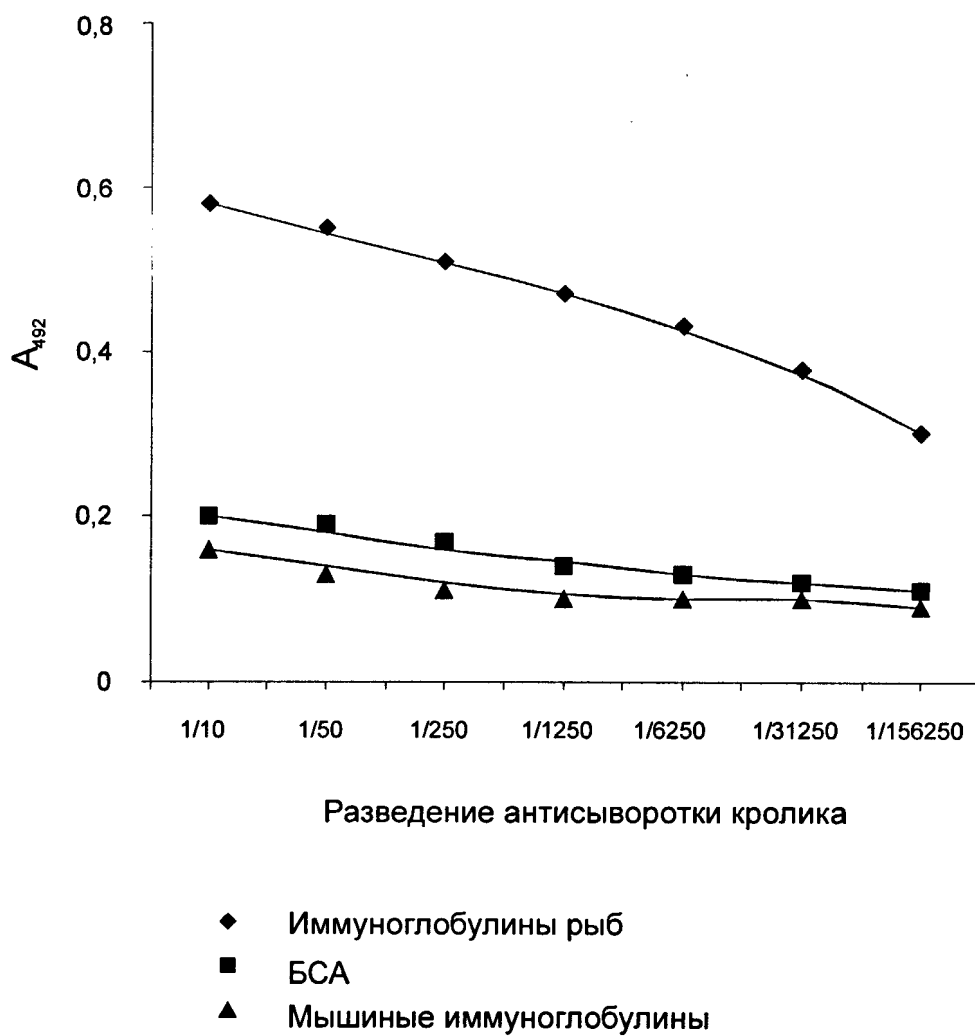


Рис. 15. Тестирование антисыворотки кролика к иммуноглобулинам рыб методом твердофазного иммуноферментного анализа

конъюгата 1:4 000, при котором значение оптической плотности максимально, а реакция фона не превышает 0,2 (рис. 16).

Концентрацию иммуноглобулинов кролика выбирали как минимальную, при которой фоновая реакция была наименьшей, а оптическая плотность — наибольшей. Для работы выбрана концентрация 100 мкг/мл, что при величине 0,2 оптической плотности фоновой реакции соответствует плато в профиле кривой зависимости оптической плотности от концентрации иммуноглобулинов кролика (рис. 17).

Оптимальное разведение неразрушенных бактериальных клеток выбирали как соответствующее окончанию плато в профиле кривой зависимости оптической плотности от разведения клеток. Для работы выбрано разведение 1:100 (рис. 18).

Оптимальную концентрацию разрушенных ультразвуком бактериальных клеток выбирали так же. Для работы выбрана концентрация 10 мкг/мл (рис. 19).

При обработке данных анализа применяли оригинальное программное обеспечение, позволяющее получать данные от фотометра в численном виде и передавать их в электронные таблицы, такие как Microsoft Excel.

Эти результаты явились основой для экспериментальной разработки тест-системы на основе твердофазного ИФА, которую апробировали при обследовании радужной форели, заболевшей энтеритом.



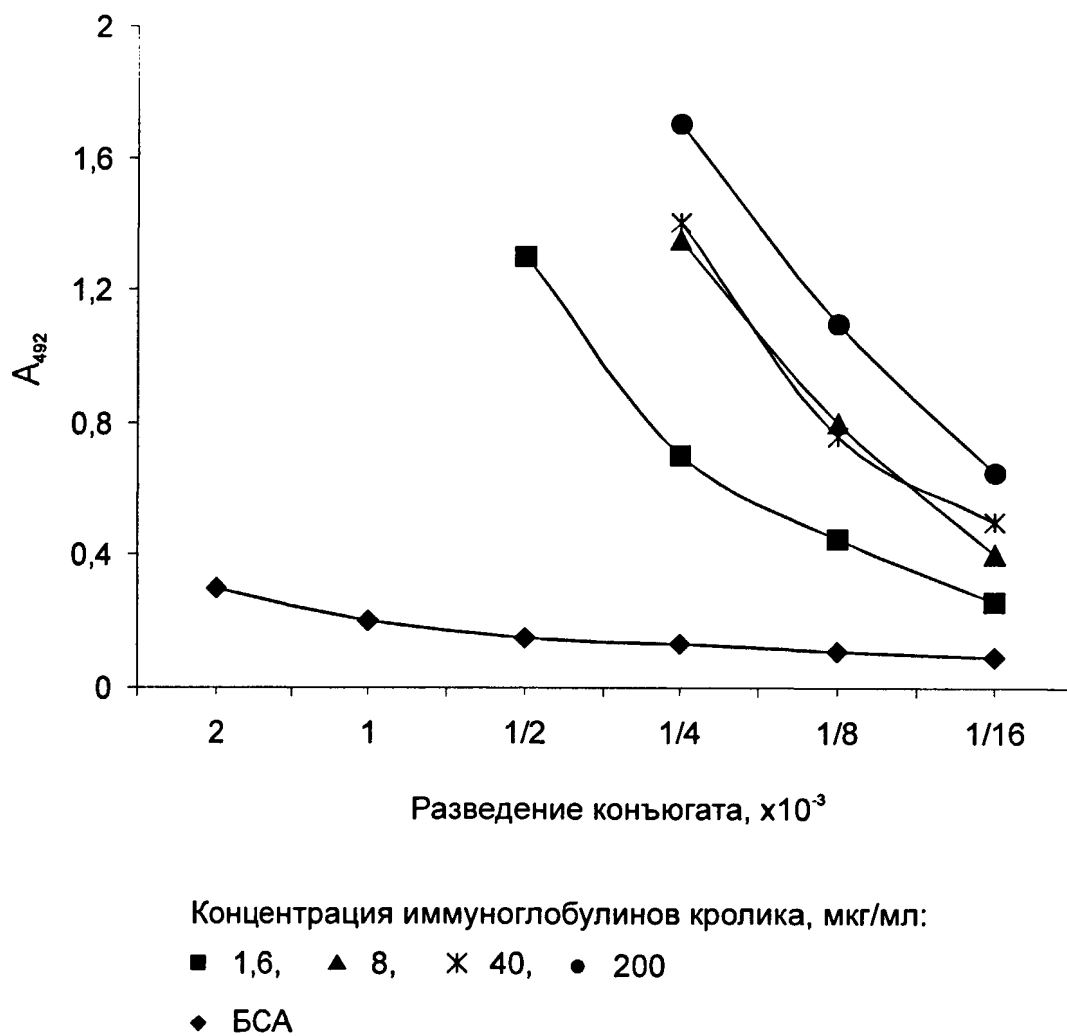


Рис. 16. Стандартизация рабочего разведения конъюгата пероксидазы хрена с антителами осла к иммуноглобулинам кролика

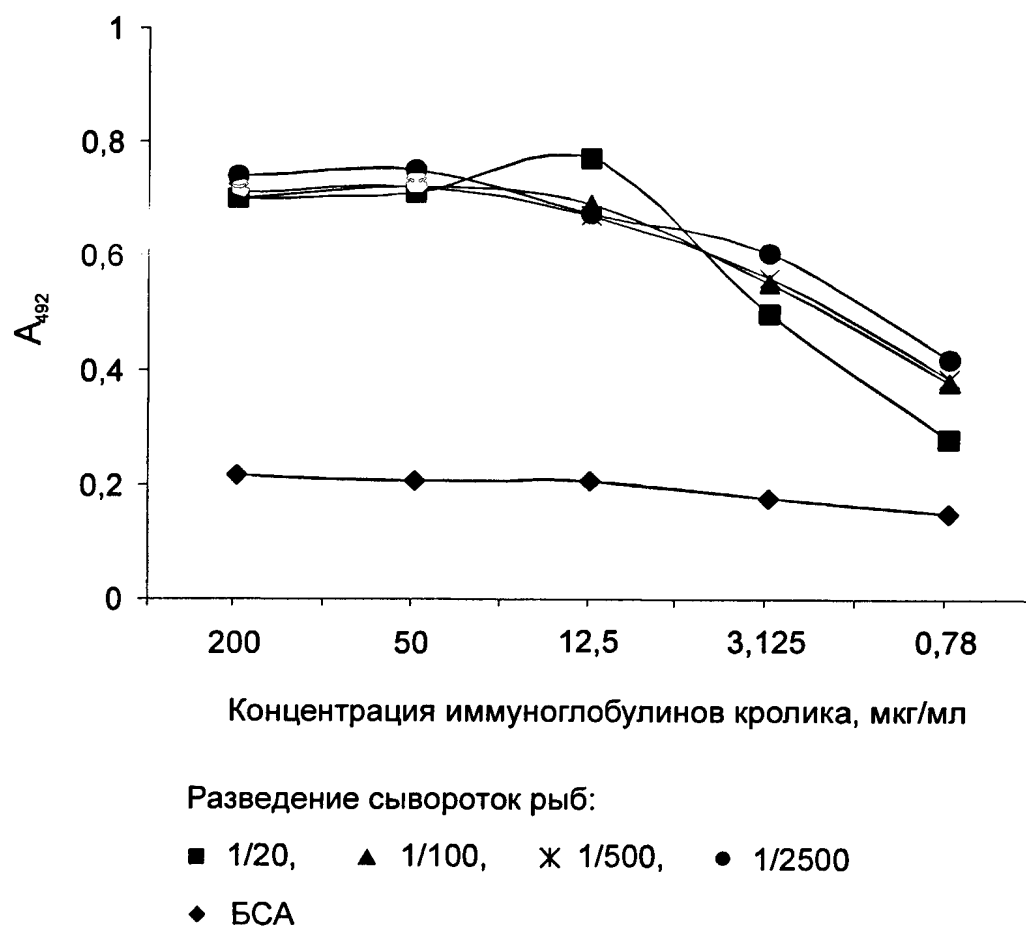


Рис. 17. Стандартизация концентрации иммуноглобулинов кролика

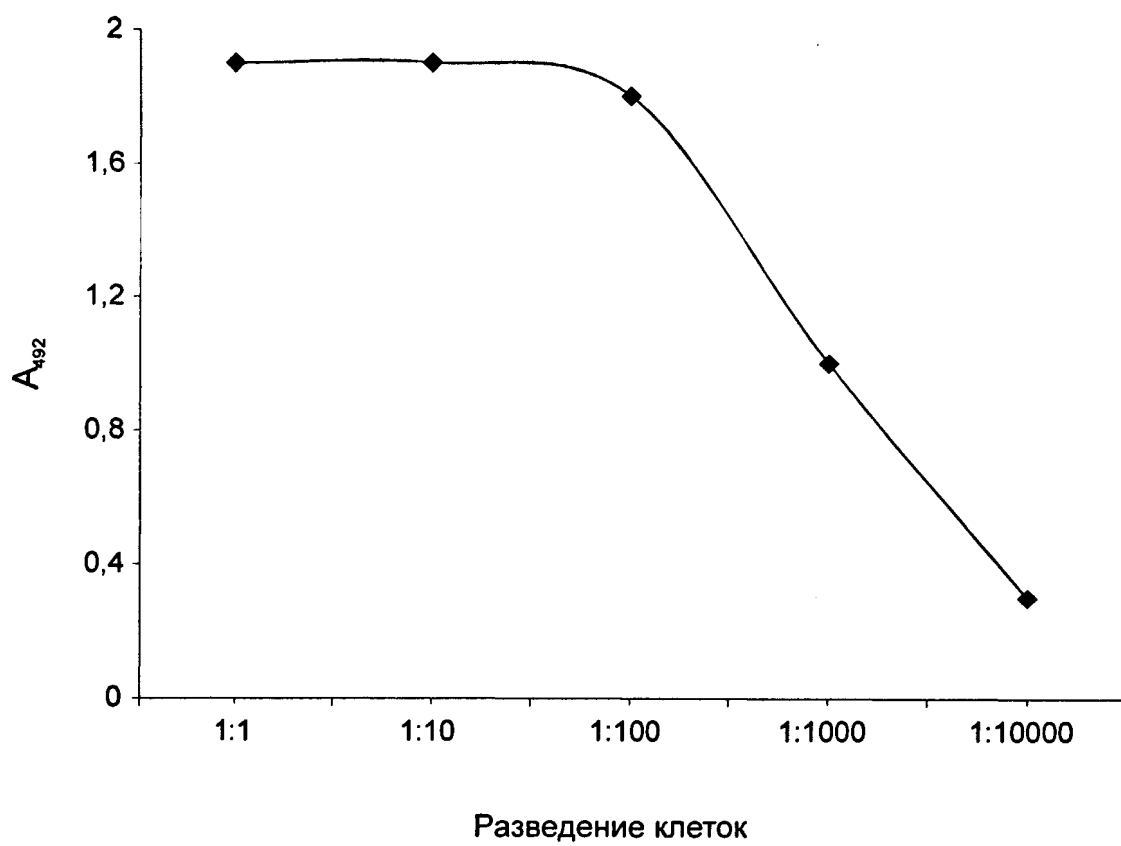
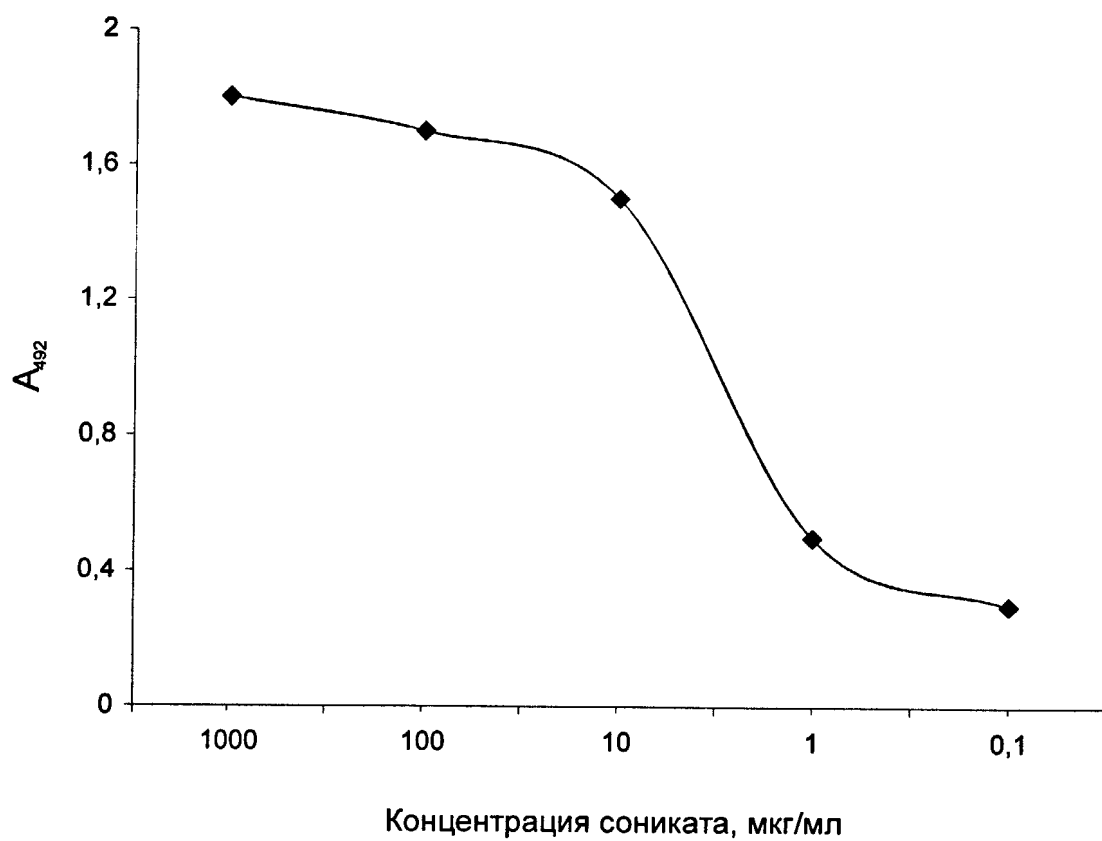


Рис. 18. Стандартизация рабочего разведения клеток бактерий



**Рис. 19.** Стандартизация рабочей концентрации разрушенных ультразвуком клеток бактерий

**5.2.2. Применение метода твердофазного иммуноферментного анализа для определения специфического взаимодействия сывороток рыб с возбудителями энтерита радужной форели**

Для исследования иммунных реакций у рыб методом твердофазного ИФА с помощью разработанной тест-системы и характеристики специфического взаимодействия сывороток рыб с возбудителями заболеваний использовали те же группы рыб, что и в экспериментах по изучению влияния лекарственных препаратов при лечении энтерита радужной форели.

В качестве антигена в работе использовали культуры бактерий рода *Alcaligenes* и вида *Citrobacter freundii*, так как при бактериологическом анализе заболевших рыб именно эти бактерии были обнаружены в большом количестве. Бактерии вида *Escherichia coli* присутствовали в бактериологических пробах в единичном количестве и были выбраны для данного исследования в качестве контроля. Бактерии использовали в неразрушенном и разрушенном ультразвуком виде для сравнения влияния поверхностных и внутриклеточных антигенов, а также для сравнения влияния размеров сенсibiliзирующих агентов.

На рис. 20 показано взаимодействие сывороток рыб с неразрушенными и разрушенными ультразвуком клетками бактерий. Из графиков следует, что для каждой серии, где в качестве сенсibiliзирующего антигена использовали бактерии *Alcaligenes sp.* и *Citrobacter freundii* (графики А и Б), профиль кривых экспериментальных и контрольной групп совпадает. При начальных разведениях (1:20 – 1:5 120) оптическая плотность в лунках с сыворотками здоровых рыб выше, чем в лунках с сыворотками заболевших рыб. При более высоких разведениях

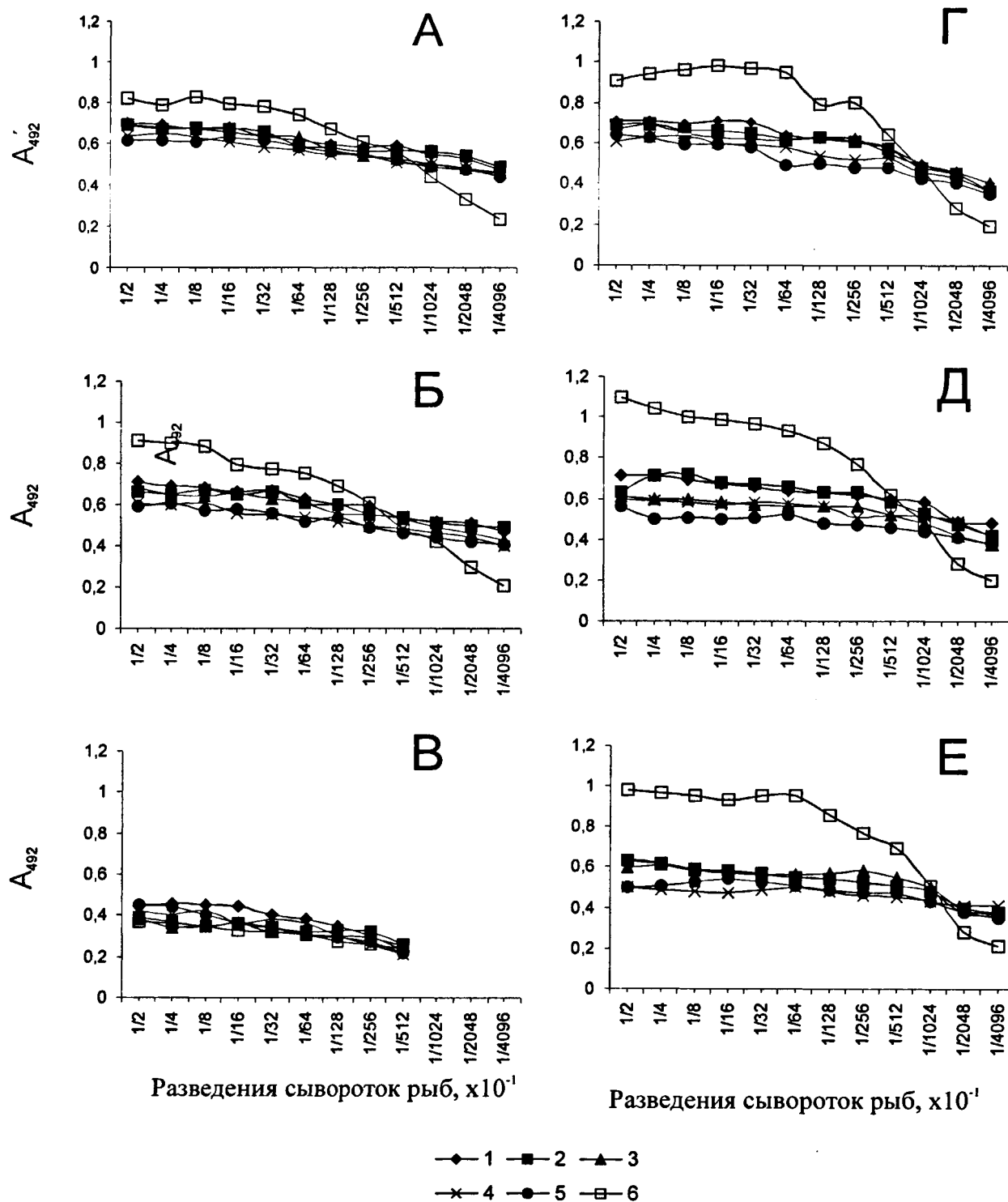


Рис. 20. Твердофазный ИФА сывороток крови рыб (1 — нифулин, 2 — биовит, 3 — кормогризин, 4 — бацилихин, 5 — нелеченые, 6 — здоровые). А, Б, В: взаимодействие сывороток рыб с неразрушенными клетками бактерий (*Alcaligenes sp.*, *Citrobacter freundii*, *Ecsherichia coli* соответственно); Г, Д, Е: взаимодействие сывороток рыб с разрушенными клетками бактерий (*Alcaligenes sp.*, *Citrobacter freundii*, *Ecsherichia coli* соответственно)

(1:10 240 – 1:40 960) значения оптической плотности в лунках с сыворотками здоровых рыб резко снижаются, и при разведении 1:40 960 величина оптической плотности падает до уровня реакции фона. В экспериментальных группах при разведении сывороток от 1:20 до 1:40 960 оптическая плотность уменьшается в среднем на 0,2–0,3 единицы и при максимальном разведении значения оптической плотности превышают реакцию фона в два раза. Разница в оптической плотности лунок с сыворотками разных групп очень мала. График, полученный для серии, в которой сенсibiliзирующим антигеном служили бактерии вида *Escherichia coli* (В), отличается от первых двух тем, что лунки с образцами сывороток всех групп рыб показывают более низкую оптическую плотность как при начальных разведениях (около 0,4 при разведении 1:20), так и при конечных, соответствующих значениям фоновой реакции. Падение оптической плотности до уровня фона происходит при разведении 1:5 120. Реакция сыворотки здоровых рыб не отличается от реакции остальных групп рыб.

При ИФА, в котором в качестве сенсibiliзирующего антигена использовали разрушенные ультразвуком клетки бактерий, для трех серий экспериментов (графики Г, Д, Е — каждая серия с отдельным видом бактерий) характер поведения кривых зависимости оптической плотности от разведения сывороток в пределах групп одинаков и соответствует зависимости, полученной в экспериментах с неразрушенными бактериальными клетками видов, вызвавших заболевание (А и Б).

Таким образом, показано, что сыворотки рыб специфично взаимодействуют с энтеропатогенными бактериями, вызвавшими заболевание, причем титр сывороток заболевших рыб выше, чем титр сыворотки здоровых рыб ( $4 \times 10^4$ ). Это свидетельствует о наличии в сыворотках специфических антител к возбудителям

энтерита. По-видимому, у здоровых рыб эти антитела обладают меньшей аффинностью по сравнению с антителами заболевших рыб. В связи с этим титр специфических антител у здоровых рыб невысок, и при разведении более  $5 \times 10^{-3}$  наблюдается снижение до уровня фона значений оптической плотности. Специфические антитела заболевших рыб являются высокоаффинными, и обнаруживаются при разведении более  $4 \times 10^{-4}$ . Отсутствие различий между результатами серий экспериментов, соответствующих разным видам бактерий, объяснимо тем, что в препаратах разрушенных бактериальных клеток доминирует общий для изученных бактерий антиген.

Апробация экспериментально разработанной тест-системы на основе твердофазного ИФА позволила быстро и эффективно идентифицировать возбудителей, вызвавших инфекционное заболевание (*Alcaligenes sp.* и *Citrobacter freundii*), и диагностировать заболевание.



## 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные данные об иммунитете рыб подтверждают присутствие у рыб, как и у высших позвоночных, развитой иммунной системы, способной адекватно реагировать на нарушение гомеостаза организма рыб и противостоять внешней агрессии и внутренним нарушениям на молекулярном, надмолекулярном и клеточном уровне. Однако противоречивость накопленных данных, обусловленная значительными различиями между классами и группами рыб, лабильностью их иммунитета и его чувствительностью к изменениям условий среды обитания, а также отсутствием системного подхода к изучению иммунных механизмов рыб, не позволяет создать целостную картину организации и функционирования иммунной системы этих животных. Необходимы дальнейшие исследования, которые могли бы дополнить имеющиеся данные. Полученные в работе результаты показывают участие врожденной составляющей иммунной системы в противомикробных и противопаразитарных реакциях организма рыб и наличие специфического иммунного ответа на условно-патогенную микрофлору кишечника, вызвавшую заболевание рыб в стрессовой ситуации.

В первой части диссертационной работы предпринято исследование показателей врожденного иммунитета рыб в зависимости от инфекции и зараженности паразитами. Иммунные реакции при бактериальной инфекции изучены у радужной форели, содержащейся в условиях прудового хозяйства. Согласно данным литературы, промышленно разводимые рыбы характеризуются низкой зараженностью паразитами, но у них часты бактериальные инфекции. Исследуемые рыбы содержались при повышенной температуре и недостаточности

естественных кормов, кроме того, подверглись стрессу при перевозке из одного рыбного хозяйства в другое. У них был ослаблен иммунитет, в кишечнике размножились условно-патогенные сапрофитные микроорганизмы (*Alcaligenes sp.* и *Citrobacter freundii*), и рыбы, в обычных условиях устойчивые к этим симбионтам, заболели энтеритом. Инфицирование вызвало активацию механизмов врожденного иммунитета: изменился белковый состав сыворотки крови заболевших рыб, повысилась концентрация лизоцима. Возросла скорость оседания эритроцитов, в крови уменьшилась концентрация гемоглобина. При лечении использовали четыре лекарственных препарата различных классов. Показано, что терапия приводит к улучшению состояния рыб (нормализации внешнего вида, кишечника, печени, уменьшению количества возбудителей заболевания или их исчезновению, улучшению биохимических показателей сыворотки крови), однако эффективность терапевтических агентов различна: наибольший положительный эффект при лечении энтерита рыб проявили комплексный препарат нифулин и антибиотик тетрациклинового ряда биовит-80.

Врожденную иммунореактивность при паразитарной инвазии наблюдали у морских рыб в естественных условиях обитания (наваги и трески Белого моря). В этом случае инфекционные заболевания редки, однако паразиты являются характерными симбионтами морских рыб. Исследуемые рыбы являются основными дефинитивными хозяевами скребня *Echinorhynchus gadi*. Обнаружено, что у зараженных скребнем рыб уменьшилось содержание в крови форменных элементов, гемоглобина, снизилась скорость оседания эритроцитов. Установлено, что у зараженных паразитами наваги и трески в естественных условиях обитания изменились показатели врожденного гуморального иммунитета: на

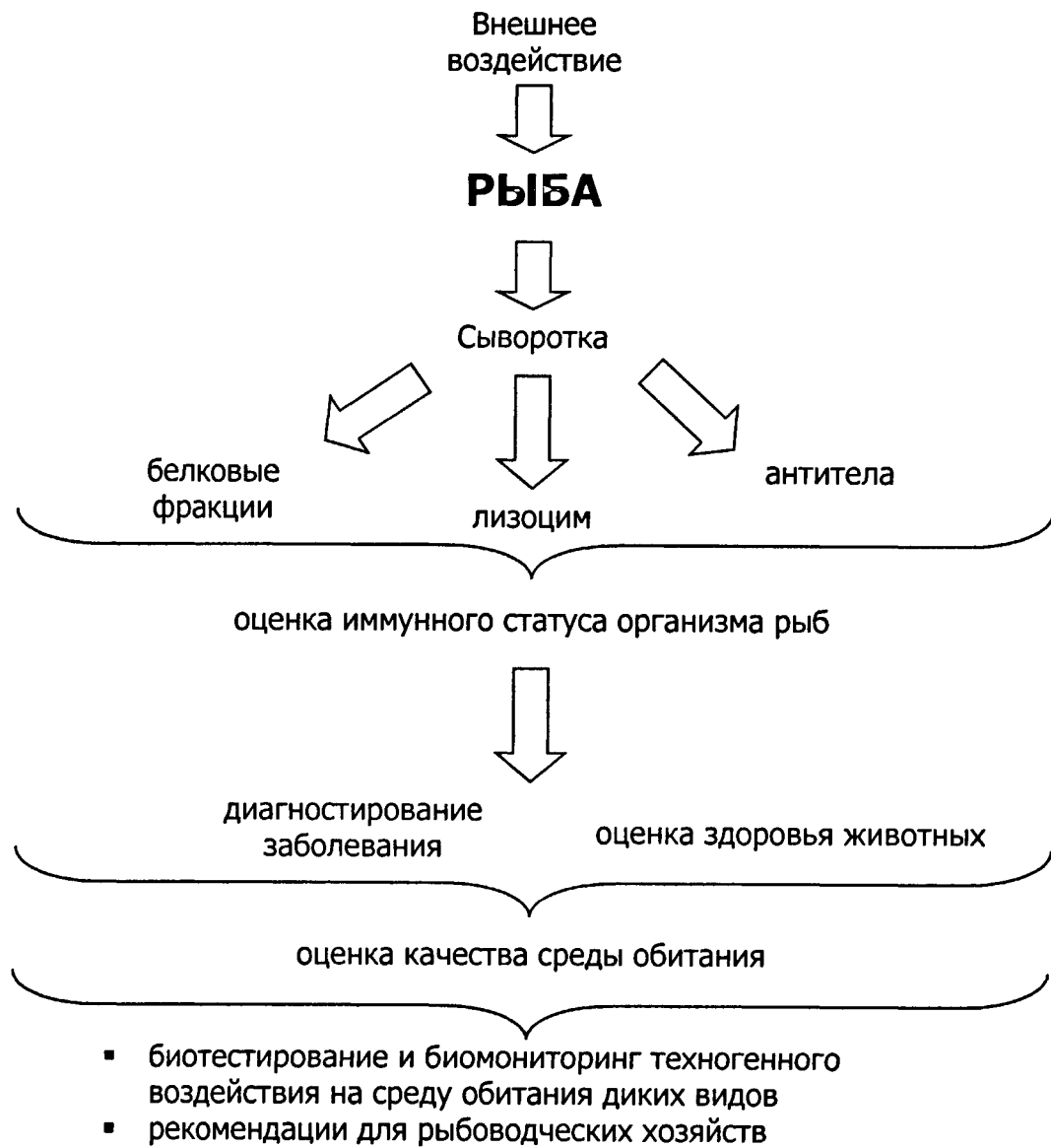
электрофореграмме сыворотки крови выявлены новые фракции белка, в сыворотке увеличилась общая концентрация белка и возрос уровень лизоцима.

Сравнение комплексных данных, полученных в первой части работы, показало, что факторы врожденного иммунитета являются надежными и достоверными показателями состояния иммунитета рыб. Нарушение целостности внутренней среды организма рыб вследствие внешней агрессии стимулирует повышение концентрации белка, лизоцима в сыворотке крови рыб и появление новых белков. Отклонение этих показателей от нормы свидетельствует о патологическом состоянии животных. Увеличение содержания лизоцима при паразитарной инвазии позволяет предположить существование новых, неизученных свойств этого белка.

Во второй части работы экспериментально разработана тест-система на основе метода твердофазного ИФА, позволяющая определить наличие специфических антител в сыворотках рыб и диагностировать возбудителя заболевания. Тест-система апробирована для обнаружения специфических антител у радужной форели, заболевшей энтеритом, вызванной условно-патогенными сапрофитными бактериями *Alcaligenes sp.* и *Citrobacter freundii*. Из литературы известно, что не всегда в ходе иммунного ответа вырабатываются специфические антитела, однако полученные в работе результаты показывают, что в сыворотке радужной форели присутствуют антитела, специфические к возбудителям заболеваний.

Таким образом, в работе охарактеризованы параметры врожденного и приобретенного иммунитета радужной форели. Эти данные, а также обсуждаемые в

литературе механизмы иммунной защиты у рыб, свидетельства их лабильности и зависимости от условий среды обитания позволяют предложить схему использования показателей иммунной системы рыб (содержание в сыворотке белковых фракций, лизоцима, антител) как в естественных условиях обитания, так и в аквакультуре, в качестве биомаркеров для определения состояния здоровья животных и диагностирования заболевания, а также для оценки на основе этих данных качества среды обитания, проведения биотестирования и биомониторинга техногенного воздействия на среду обитания диких видов, разработки рекомендаций для рыбоводческих хозяйств (рис. 21).



**Рис. 21.** Схема использования показателей врожденного и приобретенного гуморального иммунитета рыб для оценки внешнего воздействия

## 7. ВЫВОДЫ

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

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

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

тест-системы увеличение в сыворотке крови рыб титра антител к микроорганизмам флоры кишечника позволяет определять патогены рыб.

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

## ЛИТЕРАТУРА

1. Антибиотики, сульфаниламиды и нитрофураны в ветеринарии. Справочник / Сост.: В.Ф. Ковалев, И.Б. Волков, Б.В. Виолин и др. М.: Агропромиздат, 1989.
2. Балахнин И.А. 1986. Частота встречаемости естественных антител у карпа и определение иммунологической зрелости сеголетков. Доклады АН СССР, серия Б, 6:62-64.
3. Балахнин И.А., Томиленко В.Г., Темниханов Ю.Д., Козиненко И.И., Литвиненко В.В., Мазьяр М.И., Компанеев Э.В. 1989. Иммунологические и биологические характеристики украинских линий *Cyprinus carpio*. Вопросы ихтиологии, 29:650-655.
4. Балахнин И.А., Лукьяненко В.И. 1991. Активация неспецифических факторов защиты рыб углеводами. Доклады АН СССР, 318:1254-1256.
5. Балахнин И.А., Неборачин И.С. 1991. Трансплантационные реакции у рыб. Критический анализ. Доклады АН СССР, 318:62-66.
6. Балахнин И.А. 1992. Дискуссионные вопросы иммунологии рыб. 8-я научная конференция по экологической физиологии и биохимии рыб, 30 сент.-3 окт. 1992 г. Тезисы докладов, 1:16-17.
7. Бауер О.Н., Мусселиус В.А., Стрелков Ю.А. 1981. Болезни прудовых рыб / Изд. 2-е, переработанное и дополненное. М.: Легкая и пищевая промышленность.
8. Безгачина Т.В., Шумилов К.В., Бондаренко В.З. 1995. Идентификация возбудителей «тепловодного» и «холодноводного» вибриоза у стальноголового



лосося, культивируемого в Черноморском регионе на побережье Северного Кавказа в условиях ухудшения экологической среды. Тезисы докладов Международного симпозиума по морекультуре в г. Краснодаре в п. Небуг, 15-16.

9. Безгачина Т.В. 2000. Международный ихтиопатологический рейс судна «Вальтер Хервиг III» в Балтийском море. Паразиты и болезни рыб: сборник научных трудов. М: ВНИРО, с. 16-19.
10. Быховская-Павловская И.Е. 1985. Паразиты рыб. Руководство по изучению. Л.: Наука.
11. Васильков Г.В. 1999. Паразитарные болезни рыб и санитарная оценка рыбной продукции. М: ВНИРО.
12. Вихман А.А. 1984. Иммунопрофилактика болезней рыб. Биологические ресурсы гидросферы и их использование. Биологические основы рыбоводства: паразиты и болезни рыб. М.: Наука.
13. Галактионов В.Г. 1998. Иммунология. М.: МГУ.
14. Гиченок Л.А. 1996. Паразитарная система *Echinorhynchus gadi* в условиях беломорской сублиторали. Тезисы IV Всероссийского симпозиума по популяционной биологии паразитов, 27-28.
15. Говядинова А.А. 1998. Исследование локализации и особенностей строения кроветворной ткани у осетровых рыб. Автореф. дис. ... канд. биол. н. М., 24 с.
16. Говядинова А.А., Ланге М.А., Хрущов Н.Г. 2000. Гемопозитические органы уникальной локализации у осетровых рыб. Онтогенез, 31:440-445.

17. Гревати А.Д. 1991. Электронномикроскопическое исследование клеток крови и кроветворных органов зеркального карпа. Автореф. дис. ... канд. биол. н. М., 24 с.
18. Добринская Л.А. 1973. Иммунологическая дифференциация видов и популяций рыб. Труды Ин-та экологии растений и животных Уральского филиала АН СССР, 86:95-106.
19. Егоров Н.С. 1994. Основы учения об антибиотиках. М: МГУ.
20. Золотова Т.Е. 1989. Экспериментальное исследование кроветворения у рыб. Автореф. дис. ... канд. биол. н. М., 24 с.
21. Иванова Н.Т. 1983. Атлас клеток крови рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность.
22. Исаева Н.М., Козиненко И.И. 1992. Влияние химических соединений на иммунный статус рыб в аквакультуре. Вопросы ихтиологии, 32:157-167.
23. Исаева Н.М., Козиненко И.И., Балахнин И.А. 1992. Перспективные способы оздоровливания рыб в аквакультуре: обзор. Вопросы ихтиологии, 32:140-147.
24. Калашников Г.Н. 1939. Состав крови рыб. Уч. зап. МГУ, сер. гидробиол., вып. 33.
25. Калашникова З.М. 1976. О классификации морфологических элементов крови рыб. Вопросы ихтиологии, 16:510-525.
26. Киташова А.А., Кондратьева И.А., Наумова А.Ю. 1997. Исследование белков сыворотки крови рыб в норме и при патологии с помощью ИФА. Межведомственная ихтиологическая комиссия, РАСХН, Итоги научно-

практических работ в ихтиопатологии (информационный бюллетень). М., с. 61-63.

27. Клаус Дж. (ред.) 1990. Лимфоциты: методы. М.: Мир.
28. Кокряков В.Н. 1999. Биология антибиотиков животного происхождения. С.-П.: Наука.
29. Компанеец Э.В., Темниханов Ю.Д., Просяная В.В. 1990. Иммунологические показатели у карпа при экспериментальном вирусном и бактериальном заражении. Рыбное хозяйство, 44:61-64.
30. Кондратьева И.А., Воробьева Н.В., Буракова О.В., Фрезе К.В., Егорова С.Г., Мойсенович М.М., Киркин А.Ф., Пинегин Б.В., Симонова А.В., Киташов А.В., Рокк Ф. Практикум по иммунологии / Под ред. И.А. Кондратьевой, В.Д. Самуилова. М.: МГУ, 2001.
31. Кондратьева И.А., Киташова А.А., Наумова А.Ю. 2002. Действие лекарственных препаратов на молодь радужной форели *Oncorhynchus mykiss* Richardson. Вопросы рыболовства, №5 (9), т. 3 (в печати).
32. Криксунов Е.А., Павлов Д.С., Бобырев А.Е., Полонский Ю.М. 1999. Проблемы научно-методического обеспечения оценок ущербов рыбному хозяйству от разработки нефтегазовых месторождений на морском шельфе. Сборник материалов международного семинара 27-29 апреля 1999 г. М., с. 62-70.
33. Кулинич Н.Н., Галатюк А.Е. 1986. Определение Т- и В-лимфоцитов в периферической крови карпа. Ветеринария, 11:28-29.
34. Купер Э. 1980. Сравнительная иммунология. М.: Мир.

35. Кэтти Д. (ред.) 1991. Антитела: Методы. В 2 т. М.: Мир.
36. Лабинская А.С. 1978. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина.
37. Лакин Г.Ф. 1990. Биометрия / Изд. 4-е, переработанное и дополненное. М.: Высш. шк.
38. Ланге М.А., Потапина Н.В., Хрущов Н.Г. 1987. Морфологическое и автордиографическое исследование крови личинки ручьевой миноги (пескоройки) *Lampetra planeri* Bloch. в норме и в условиях воспалительного процесса. Ж. Общ. Биол., 48:411-416.
39. Ланге М.А., Потапина Н.В., Хрущов Н.Г. 1990. Морфологическое и автордиографическое исследование кроветворных органов личинок ручьевой миноги (*Lampetra planeri*) разного возраста. Ж. Общ. Биол., 51:796-808.
40. Лукьяненко В.И. 1989. Иммунобиология рыб. Врожденный иммунитет. 2-е изд., перераб и доп. М.: Агропромиздат.
41. Медников Б.М., Попов Л.С., Антонов А.С. 1973. Характеристики первичной структуры ДНК как критерии для построения естественной системы рыб. Ж. Общ. Биол., 34:516-529.
42. Микитюк П.В. 1984. Справочник по болезням прудовых рыб. М.: Урожай.
43. Наумова А.М., Стрелков Ю.А., Шестаковская Е.В., Ширшов В.Я., Кондратьева И.А. 1997. Диагностика и профилактика новых, малоизученных и ассоциативных болезней карпа и форели в рыбоводных хозяйствах. Межведомственная ихтиологическая комиссия, РАСХН, Итоги научно-

практических работ в ихтиопатологии (информационный бюллетень). М., с. 81-83.

44. Определитель бактерий Берджи. В 2 т. / Дж. Хоулт, Н. Криг. М.: Мир, 1997.
45. Сильченко Г.Ф., Попов А.А. 1992. Влияние экологических факторов на распространение лигулеза леща Куйбышевского водохранилища. Экология, 6:51-56.
46. Скворцов А.К. 1947. О строении селезенки костистых рыб. ДАН СССР, 58:1159-1162.
47. Смуров А.В. 2000. Экологическая диагностика. Сер. Экологическая безопасность России. М., с. 391-404.
48. Соколов В.Д., Рабинович М.И., Горшков Г.И. и др. 2000. Фармакология / Под ред. В.Д. Соколова. 2-е изд., испр. и доп. М.: Колос.
49. Солдатов А.А. 1988. Эритропоэз и гемоглобиновая система у бычка *Gobius batrachocephalus* при температурной адаптации. Ж. эвол. биох. и физиол., 4:601-603.
50. Строев Е.А., Макарова В.Г. 1986. Практикум по биологической химии. М.: Высшая школа.
51. Суворов Е.К. 1948. Основы ихтиологии. Государственное издательство «Советская наука».
52. Фонталин Л.Н. 1988. Проблема происхождения иммунной системы позвоночных животных. Иммунология, 3:5-20.

53. Фонталин Л.Н. 1998. Происхождение антигенраспознающей иммунной системы позвоночных. Молекулярно-биологические и иммунологические аспекты. Иммунология, 5:33-44.
54. Хрущов Н.Г., Ланге М.А., Золотова Т.Е., Бессонов А.В. 1993. Характеристика клеток эритроидного ростка у зеркального карпа (перспективы использования при оценке физиологического состояния рыб). Изв. АН, серия биол., 1:83-87.
55. Шульман С.С., Шульман-Альбова Р.Е. 1953. Паразиты рыб Белого моря. М.-Л.: АН СССР.
56. Юнчис О.Н. 2000. Паразиты как индикаторы состояния среды. Паразиты и болезни рыб: сборник научных трудов. М: ВНИРО, с. 146-152.
57. Ярилин А.А. 1999. Основы иммунологии. М.: Медицина.
58. Aaltonen T.V., Jokinen E.I., Salo H.M., Markkula S.E., Lammi R. 2000. Modulation of immune parameters of roach, *Rutilus rutilus*, exposed to untreated ECF and TCF bleached pulp effluents. Aquat. Toxicol., 47:277-289.
59. Abelli L., Picchietti S., Romano N., Mastrola L., Scapigliati G. 1996. Immunocytochemical detection of thymocyte antigenic determinants in developing lymphoid organs of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). Fish Shellfish Immunol., 6:493-505.
60. Abelli L., Picchietti S., Romano N., Mastrola L., Scapigliati G. 1997. Immunohistochemistry of gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). Fish Shellfish Immunol., 7:235-246.

61. Abelli L., Baldassini M.R., Mastrolia L., Scapigliati G. 1999. Immunodetection of lymphocyte subpopulations involved in allograft rejection in a teleost, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Cell. Immunol.*, 191:152-160.
62. Acton R.T., Weinheimer P.F., Hall S.J., Niedermeier W., Shelton E., Bennett J.C. 1971. Tetrameric immune macroglobulins in three orders of bony fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68:107-111.
63. Acton R.T., Niedermeier W., Weinheimer P.F., Clem L.W., Leslie G.A., Bennett J.C. 1972. The carbohydrate composition of immunoglobulins from diverse species of vertebrates. *J. Immunol.*, 109:371-381.
64. Agius C. 1981. Preliminary study on the ontogeny of the melano-macrophages of teleost haematopoietic tissues and age-related changes. *Dev. Comp. Immunol.*, 5:597-606.
65. Alexander J.B., Ingram G.A. 1992. Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2:249-279.
66. Al-Harbi A.H., Austin B. 1992. The immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), to lipopolysaccharide from a fish-pathogenic *Cytophaga*-like bacterium. *J. Fish Dis.*, 15:449-452.
67. Anderson D.P., Dixon O.W. 1989. Suppression of antibody-producing cells in rainbow trout spleen sections exposed to copper in vitro. *J. Aquat. Anim. Health*, 1:57-61.

68. Anderson D.P., Jeney G. 1992. Immunostimulants added to injected *Aeromonas salmonicida* bacterin enhance the defense mechanism and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Vet. Immunol. Immunopathol., 34:379-389.
69. Angelidis P., Baudin-Laurencin F., Youinou P. 1991. Drug-induced modulation of immune function in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Int. J. Immunopathol. Pharmacol., 4:163-171.
70. Avtalion R.R., Shahrabani R. 1975. Studies on phagocytosis in fish: in vitro uptake and killing of living *Staphylococcus aureus* by peripheral leucocytes of carp (*Cyprinus carpio* L.). Immunology, 29:1181-1187.
71. Baumann P.C. 1998. Epizootics of cancer in fish associated with genotoxins in sediment and water. Mutation Res., 411:227-233.
72. Baunly M.O.D., Quentel C., Fournier V., Lamour F., Gouvello, R.L. 1996. Effect of long-term oral administration of  $\beta$ -glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. Dis. Aquat. Org., 26:139-147.
73. Beacham T.D., Evelyn T.P.T. 1992. Population variation in resistance of pink salmon to vibriosis and furunculosis. J. Aquat. Anim. Health, 4:168-173.
74. Belov K., Harrison G.A., Miller R.D., Cooper D.W. 2001. Characterisation of the kappa light chain of the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). Vet. Immunol. Immunopathol., 78:317-324.
75. Bengten E., Leanderson T., Pilstrom L. 1991. Immunoglobulin heavy chain cDNA from the teleost Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): nucleotide sequences of secretory



and membrane form show an unusual splicing pattern. Eur. J. Immunol., 21:3027-3033.

76. Biggar W.D., Sturgess J.M. 1977. Role of lysozyme in the microbicidal activity of rat alveolar macrophages. Infect. Immun., 16:974-982.
77. Blazer V.S. 1992. Nutrition and disease resistance in fish. Annu. Rev. Fish Dis., 2:309-323.
78. Bloom W., Fawcett D.W. 1986. A text book of Histology. 11<sup>th</sup> ed., W.B. Saunders Company.
79. Bly J.E., Clem L.W. 1991. Temperature-mediated processes in teleost immunity: In vitro immunosuppression induced by in vivo low temperature in channel catfish. Vet. Immunol. Immunopathol., 28:365-377.
80. Bly J.E., Clem L.W. 1992. Temperature and teleost immune functions. Fish Shellfish Immunol., 2:159-172.
81. Botham J.W., Manning M.J. 1981. The histogenesis of the lymphoid organs in the carp *Cyprinus carpio* L. and the ontogenetic development of allograft reactivity. J. Fish Biol., 19:403-414.
82. Bowden T.J., Butler R., Bricknell I.R., Ellis A.E. 1997. Serum trypsin-inhibitory activity in five species of farmed fish. Fish Shellfish Immunol., 7:377-385.
83. Bower S.M., Evelyn T.P.T. 1988. Acquired and innate resistance to the haemoflagellate *Cryptobia salmositica* in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). Dev. Comp. Immunol., 12:749-760.

84. Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
85. Brubacher J.L., Secombes C.J., Zou J., Bols N.C. 2000. Constitutive and LPS-induced gene expression in a macrophage-like cell line from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Comp. Immunol.*, 24:565-574.
86. Bucke D., Dixon P.F., Feist S.W., Law R.J. 1989. The measurement of disease susceptibility in dab, *Limanda limanda* L., following long-term exposure to contaminated sediments: Preliminary studies. *Resp. Mar. Org. Pollutants*, 28:363-367.
87. Buchmann K., Oestergaard L., Glammann J. 1992. Affinity purification of antigen-specific serum immunoglobulin from the European eel (*Anguilla anguilla*). *Scand. J. Immunol.*, 36:89-97.
88. Buchmann K., Sigh J., Nielsen C.V., Dalgaard M. 2001. Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Vet. Parasitol.*, 100:105-116.
89. Buentello J.A., Gatlin D.M. III. 1999. Nitric oxide production in activated macrophages from channel catfish (*Ictalurus punctatus*): influence of dietary arginine and culture media. *Aquaculture*, 179:513-521.
90. Cadwell C.A., Hinshaw J.M., Kattesh H.G. 1990. Validation of a solid-phase enzyme immunoassay technique for the measure of plasma cortisol in rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health*, 2:228-230.

91. Caspi R.R., Avtalion R.R. 1984. Evidence for the existence of an IL-2 like lymphocyte growth promoting factor in a bony fish *Cyprinus carpio*. Dev. Comp. Immunol., 8:51-60.
92. Chilmonczyk S. 1983. The thymus of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) light and electron microscopic study. Dev. Comp. Immunol., 7:59-68.
93. Clem L.W., Sizemore R.C., Ellsaesser C.F., Miller N.W. 1985. Monocytes as accessory cells in fish immune responses. Dev. Comp. Immunol., 9:803-809.
94. Clerton P., Troutaud D., Verlhac V., Gabaudan J., Deschaux P. 2001. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. Fish Shellfish Immunol., 11:1-13.
95. Cossarini-Dunier M., Demael A., Siwicki A.K. 1990. In vivo effect of the organophosphorus insecticide trichlorphon on the immune response of carp (*Cypronus carpio*): Effect of contamination on antibody production in relation to residue level in organs. Ecotoxicol. Environ. Saf., 19:93-98.
96. Dethloff G.M., Bailey H.C., Maier K.J. 2001. Effects of dissolved copper on select hematological, biochemical, and immunological parameters of wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch. Environ. Contam. Toxicol., 40:371-380.
97. Dixon B., Shum B.P., Adams E.J., Magor K.E., Parham P. 1997. Isolation of a beta-chemokine like cDNA from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Dev. Comp. Immunol., 21:187.
98. Dos Santos N.M.S., Taverne-Thiele J.J., Barnes A.C., van Muiswinkel W.B., Ellis A.E., Rombout J.H.W.M. 2001a. The gill is a major organ for antibody secreting cell

- production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. *piccicola* bacterin: an ontogenetic study. Fish Shellfish Immunol., 11:65-74.
99. Dos Santos N.M.S., Taverne-Thiele J.J., Barnes A.C., Ellis A.E., Rombout J.H.W.M. 2001b. Kinetics of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) systemic and mucosal antibody secreting cell response to different antigens (*Photobacterium damsela* ssp. *piccicola*, *Vibrio anguillarum* and DPN). Fish Shellfish Immunol., 11:317-331.
100. Douglas S.E., Gallant J.W., Gong Z., Hew C. 2001. Cloning and developmental expression of a family of pleurocidin-like antimicrobial peptides from winter flounder, *Pleuronectes americanus* (Walbaum). Dev. Comp. Immunol., 25:137-147.
101. Dustin L.B., Shea C.M., Soberman R.J., Lu C.Y. 1990. Docosahexaenoic acid, a constituent of rodent fetal serum and fish oil diets, inhibits acquisition of macrophage tumoricidal function. J. Immunol., 144:4888-4897.
102. Ellis A.E. 1977. The leucocytes of fish: a review. J. Fish Biol., 11:435-491.
103. Ellis A.E. 1980. Antigen trapping in the spleen and kidney of the plaice *Pleuronectes platessa* L. J. Fish Dis., 3:413-426.
104. Ellis A.E. 1986. The function of teleost fish lymphocytes in relation to inflammation. Int. J. Tissue React., 8:263-270.
105. Ellis A.E. 1987. Inhibition of the *Aeromonas salmonicida* extracellular protease by  $\alpha_2$ -macroglobulin in the serum of rainbow trout. Microb. Pathog., 3:167-177.

106. Erdal J.I., Evensen O.E., Kaurstad O.K., Lillehaug A., Solbakken R., Thorud K. 1991. Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. *Aquaculture*, 98:363-379.
107. Espelid S., Lokken G.B., Steiro K., Bogwald J. 1996. Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 6:95-110.
108. Estepa A., Frias D., Coll J.M. 1992. Susceptibility of trout kidney macrophages to viral haemorrhagic septicemia virus. *Viral Immunol.*, 5:283-292.
109. Estevez J., Leiro J., Santamarina M.T., Ubeira F.M. 1995. A sandwich immunoassay to quantify low levels of turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 45:165-174.
110. Evans D.L., Jaso-Friedmann L. 1992. Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2:109-121.
111. Faisal M., Huggett R.J. 1993. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the activity of lymphocytes of the spot *Leiostomus xanthurus*. *Mar. Environ. Res.*, 35:121-124.
112. Fange R. 1986. Lymphoid organs in sturgeons (Acipenseridae). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12:153-161.
113. Fichtelius K.E., Finstad J., Good R.A. 1968. Bursa equivalent of bursaless vertebrates. *Lab. Invest.*, 19:339-351.

114. Flajnik M.F., Ohta Y., Namikawa-Yamada C., Nonaka M. 1999. Insight into the primordial MHC from studies in ectothermic vertebrates. *Immunol. Rev.*, 167:59-67.
115. Fletcher T.C., White A. 1973. Antibody production in the plaice *Pleuronectes platessa*, after oral and parenteral immunization with *Vibrio anguillarum* antigens. *Aquaculture*, 1:417-428.
116. Fletcher T.C., White A. 1973. Lysozyme activity in plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Experientia*, 29:1283-1285.
117. Fock W.L., Chen C.L., Lam T.J., Sin Y.M. 2001. Roles of an endogenous serum lectin in the immune protection of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus) against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.*, 11:101-113.
118. Fonge R., Lundblad G., Lind J. 1976. Lysozyme and chitinase in blood and lymphomyeloid tissues of marine fish. *Marine Biol.*, 36:277-282.
119. Ford L.A., Thune R.L. 1992. Immunisation of channel catfish with a crude, acid-extracted preparation of motile aeromonad S-layer protein. *Biomed. Lett.*, 47:355-362.
120. Francis C.H., Ellis A.E. 1994. Production of a lymphokine (macrophage activating factor) by salmon (*Salmo salar*) leukocytes stimulated with outer membrane protein antigens of *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.*, 4:489-497.
121. Glynn P.J., Pulsford A.L. 1993. Tryptic digestion of serum immunoglobulin of the flounder, *Platichthys flesus*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 73:425-436.
122. Graham S., Secombes C.J. 1990. Cellular requirements for lymphokine secretion by rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Dev. Comp. Immunol.*, 5:75-83.

123. Graves S.S., Evans D.L., Cobb D., Dawe D.L. 1984. Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). I. Optimum requirements for target cell lysis. Dev. Comp. Immunol., 8:293-302.
124. Graves S.S., Evans D.L., Dawe D.L. 1985. Antiprotozoan activity of nonspecific cytotoxic cells (NCC) from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). J. Immunol., 134:78-85.
125. Grinde B. 1989. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. J. Fish Dis., 12:95-104.
126. Grinde B., Lie O., Poppe T., Salte R. 1988. Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. Aquaculture, 68:299-304.
127. Grizzle J.M., Schweldler A.L., Scott A.L. 1981. Papillomas of black bullheads, *Ictalurus melas* (Rafinesque), living in a chlorinated sewage pond. J. Fish Dis., 4:345-351.
128. Haas R. 1982. Transplantation reactions in the African lungfish, *Protopterus amphibius*. Transplantation, 33:249-253.
129. Hajji N., Sugita H., Ishii S., Takahashi J., Deguchi Y. 1989. Serum bactericidal activity of natural and cultured carp (*Cyprinus carpio*). In: Program of the First IMBC'89, p. 45.
130. Hardie L.J., Fletcher T.C., Secombes C.J. 1990. The effects of vitamin E on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, 87:1-13.
131. Hardie L.J., Fletcher T.C., Secombes C.J. 1991. The effects of dietary vitamin C on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, 95:201-214.

132. Hardie L.J., Laing K.J., Daniels G.D., Grabowski P.S., Cunningham C., Secombes C.J. 1998. Isolation of the first piscine transforming growth factor-beta gene: analysis reveals tissue specific expression and a potential regulatory sequence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytokine*, 10:555-563.
133. Hart L.J., Smith S.A., Smith B.J., Robertson J.L., Holladay S.D. 1997. Exposure of tilapia fish to the pesticide lindane results in hypocellularity of the primary hematopoietic organ (pronephros) and the spleen without altering activity of phagocytic cells in these organs. *Toxicology*, 118(2-3):211-221.
134. Hart S., Wrathmell A.B., Harris J.E., Grayson T.H. 1998. Gut immunology in fish: a review. *Dev. Comp. Immunol.*, 12:453-480.
135. Hashimoto K., Nakanishi T., Kurosawa Y. 1990. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6863-6867.
136. Hastings T.S., Ellis A.E. 1990. Detection of antibodies induced in rainbow trout by different *Aeromonas salmonicida* vaccine preparations. *J. Aquat. Anim. Health*, 2:135-140.
137. Hjelmeland K. 1983. Proteinase inhibitors in the muscle and serum of cod (*Gadus morhua*). Isolation and characterization. *Comp. Biochem. Physiol.*, 76B:365-372.
138. Hjeltne B., Andersen K., Ellingsen H.M. 1989. Vaccination against *Vibrio salmonicida*. The effect of different routes of administration and of revaccination. *Aquaculture*, 83:1-6.



139. Hoeglund J., Thuvander A. 1990. Indications of non-specific protective mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with diplostomosis. *Dis. Aquat. Org.*, 8:91-97.
140. Hoeglund J., Andersson J., Haerdig J. 1992. Haematological responses in the European eel, *Anguilla anguilla* L., to sublethal infestation by *Anguillicola crassus* in a thermal effluent of the Swedish Baltic. *J. Fish Dis.*, 15:507-514.
141. Holladay S.D., Smith S.A., El-Habback H., Caceci C. 1996. The influence of chlorpyrifos, an organophosphate insecticide, on the immune system of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Aquat. Anim. Health*, 8:104-110.
142. Hordvik I., Voie A.M., Glette J., Male R., Endresen C. 1992. Cloning and sequence analysis of two isotypic IgM heavy chain genes from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Eur. J. Immunol.*, 22:2957-2962.
143. Houghton G., Matthews R.A. 1990. Immunosuppression in juvenile carp, *Cyprinus carpio* L.: The effects of the corticosteroids triamcinolone acetonide and hydrocortisone 21-hemisuccinate (cortisol) on acquired immunity and the humoral antibody response to *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet. *J. Fish Dis.*, 13:269-280.
144. Houghton G., Wiergertjes G.F., Groeneveld A., Van Muiswinkel W.B. 1991. Differences in resistance of carp, *Cyprinus carpio* L., to atypical *Aeromonas salmonicida*. *Bact. Dis. Fish*, 14:333-341.
145. Houghton G., Healey L.J., Matthews T.-(R.A.). 1992. The cellular proliferative response, humoral antibody response, and cross reactivity studies of *Tetrahymena pyriformis* with *Ichthyophthirius multifiliis* in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.*, 16:301-312.

146. Hutchinson T.H., Manning M.J. 1996. Seasonal trends in serum lysozyme activity and total protein concentration in dab (*Limanda limanda* L.) sampled from Lyme Bay, UK. *Fish Shellfish Immunol.*, 6:473-482.
147. Irwin M.J., Kaattari S.L. 1986. Salmonid B lymphocytes demonstrate organ dependent functional heterogeneity. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12:39-45.
148. Ishiguro H., Kobayashi K., Suzuki M., Titani K., Tomonaga S., Kurosawa Y. 1992. Isolation of a hagfish gene that encodes a complement component. *EMBO J.*, 11:829-837.
149. Islam A.K.M.N., Woo P.T.K. 1991. *Trypanosoma danilewskyi* in *Carassius auratus*: The nature of protective immunity in recovered goldfish. *J. Parasitol.*, 77:258-262.
150. Johansen L.H., Sommer A.I. 2001. Infectious pancreatic necrosis virus infection in Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolts affects the outcome of secondary infections with infectious salmon anaemia virus or *Vibrio salmonicida*. *Dis. Aquat. Organ.*, 47:109-117.
151. Jokinen E.I., Salo H.M., Markkula S.E., Aaltonen T.M., Immonen A.K. 2000. Effects of ultraviolet light on immune parameters of the roach. *Toxicol. Lett.*, 112-113:303-310.
152. Jokinen E.I., Salo H.M., Markkula S.E., Immonen A.K., Aaltonen T.M. 2001. Ultraviolet B irradiation modulates the immune system of fish (*Rutilus rutilus*, Cyprinidae). Part III: Lymphocytes. *Photochem. Photobiol.*, 73:505-512.
153. Jolles P., Jolles J. 1984. What's new in lysozyme research? *Mol. Cell. Biochem.*, 63:165-189.

154. Jones S.R. 2001. The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 25:841-852.
155. Jorgensen J.B., Sharp G.J.E., Secombes C.J., Robertsen B. 1993. Effect of yeast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.*, 3:51-58.
156. Jorgensen J.B., Johansen A., Stenersen B., Sommer A.I. 2001. CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity. *Dev. Comp. Immunol.*, 25:313-321.
157. Junqueira L.C., Carneiro J., Kelley R.O. 1995. *Basic Histology*. Appleton & Lange, Stamford, Connecticut.
158. Kajita Y., Sakai M., Atsuta S., Kobayashi M. 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathol.*, 25:93-98.
159. Karunasagar I., Rosalind G., Karunasagar I. 1991. Immunological response of the Indian major carps to *Aeromonas hydrophila* vaccine. *Bact. Dis. Fish*, 14:413-417.
160. Kasahara M., Vazquez M., Sato K., McKinney E.C., Flajnik M.F. 1992. Evolution of the major histocompatibility complex: isolation of class II A cDNA clones from the cartilaginous fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:6688-6692.
161. Kitao T., Eshima T., Yoshida T. 1991. Analysis of protective mechanisms in cultured ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck and Schlegel, administered *Vibrio* vaccine by the immersion method. *Bact. Dis. Fish*, 14:372-381.

162. Kobayashi K., Hara A., Takano K., Hirai H. 1982. Studies on subunit components of immunoglobulin M from a bony fish, the chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Mol. Immunol., 19:95-103.
163. Kobayashi K., Tomonaga S., Hadiwara K. 1985. Isolation and characterization of immunoglobulin of hagfish, *Eptatretus burgeri*, a primitive vertebrate. Mol. Immunol., 22:1091-1097.
164. Kobayashi K., Tomonaga S. 1988. The second immunoglobulin class is commonly present in cartilaginous fish belonging to the order rajiformes. Mol. Immunol., 25:115-120.
165. Kodama H., Yamada F., Murai T., Nakanishi J., Mikami T., Izawa H. 1989. Activation of trout macrophages and production of CRP after immunization with *Vibrio anguillarum*. Dev. Comp. Immunol., 13:123-132.
166. Kokoshis P.L., Di Luzio N.R. 1979. Serum lysozyme: an index of macrophage function. J. Reticuloendothelial Society, 25:85-99.
167. Kondratieva I.A., Naumova A.Ju., Kaigorodov V.A., Bolshakova A.A., Lashenkova N.N., Naumova A.M. 1994. The immunoreactivity stimulation in *Cyprinus carpio* and *Salmo gairdneri* by nonspecific agents. 12<sup>th</sup> European Immunology Meeting. Spain, Barcelona, June, 14-17, 1994. Abst. W47/31.
168. Kondratieva I.A., Bolshakova A.A., Naumova A.V., Chernousova L.N., Naumova A.A. 1995. Modulation of lysozyme activity in fishes by extracellular bacteria infection and by treatment with drugs. 9<sup>th</sup> Internat. Congr. Immunol. USA, San-Francisco, July, 1995. Abst. W-7/04.

169. Koumans-van Diepen J.C.E., Taverne-Thiele J.J., van Rens B.T.T.M., Rombout J.H.W.M. 1994a. Immunocytochemical and flow cytometric analysis of B cells and plasma cells in carp (*Cyprinus carpio* L.): an ontogenic study. *Fish Shellfish Immunol.*, 4:19-28.
170. Koumans-van Diepen J.C.E., van de Lisdonk M.H.M., Taverne-Thiele A.J.L., Verburg-van-Kemenade B.M., Rombout J.H.W.M. 1994b. Characterization of immunoglobulin-binding leukocytes in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.*, 18:45-56.
171. Koumans-van Diepen J.C.E., Egberts E., Peixoto B.R., Taverne N., Rombout J.H.W.M. 1995. B cell and immunoglobulin heterogeneity in carp (*Cyprinus carpio* L.): an immuno(cyto)chemical study. *Dev. Comp. Immunol.*, 19:97-108.
172. Kuby J. 1992. *Immunology*. W.H. Freeman & Company, New York.
173. Laing K.J., Wang T., Zou J., Holland J., Hong S., Bols N., Hirono I., Aoki T., Secombes C.J. 2001. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor-alpha. *Eur. J. Biochem.*, 268:1315-1322.
174. Lamers C.H.J., De Haas M.J.H., Van Muiswinkel W.B. 1985. Humoral response and memory formation in Carp after injection of *Aeromonas hydrophila* bacterin. *Dev. Comp. Immunol.*, 9:65-75.
175. Lamers C.H.J., Parmentier H.K. 1985. The fate of intraperitoneally injected carbon particles in cyprinid fish. *Cell Tissue Res.*, 242:499-503.

176. Landolt M.L. 1989. The relationship between diet and the immune response of fish. *Aquaculture*, 79:193-206.
177. Lavelle E.C., Harris J.E. 1997. The processing of an orally administered protein in the digestive tract of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117A:263-275.
178. Law W.Y., Chen W.H., Song Y.L., Dufour S., Chang C.F. 2001. Differential in vitro suppressive effects of steroids on leukocyte phagocytosis in two teleosts, tilapia and common carp. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 121:163-172.
179. Lehrer R.I., Ganz T. 1996. Endogenous vertebrate antibiotics. Defensins, protegrins and other cysteine-rich antimicrobial peptides. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, 797:228-239.
180. Lie O., Evensen O., Sorensen A., Froysadal E. 1989. Study on lysozyme activity in some fish species. *Dis. Aquat. Org.*, 6:1-5.
181. Lillehaug A. 1989a. A survey on different procedures used for vaccinating salmonids against vibriosis in Norwegian fish-farming. *Aquaculture*, 83:217-226.
182. Lillehaug A. 1989b. A cost-effectiveness study of three different methods of vaccinating against vibriosis in salmonids. *Aquaculture*, 83:227-236.
183. Lillehaug A., Sevatdal S., Endal T. 1996. Passive transfer of specific maternal immunity does not protect Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry against yersiniosis. *Fish Shellfish Immunol.*, 6:521-535.
184. Lobb C.J., Clem L.W. 1981a. Phylogeny of immunoglobulin structure and function XI. Secretory immunoglobulins in the cutaneous mucus of the sheepshead *Archosargus probatocephalus*. *Dev. Comp. Immunol.*, 5:587-596.

185. Lobb C.J., Clem L.W. 1981b. Phylogeny of immunoglobulin structure and function XII. Secretory immunoglobulins in the bile of the marine teleost *Archosargus probatocephalus*. Mol. Immunol., 18:615-619.
186. Lobb C.J., Olson M.O.J., Clem L.W. 1984. Immunoglobulin light chain classes in a teleost fish. J. Immunol., 132:1917-1923.
187. Lobb C.J., Olson M.O.J. 1988. Immunoglobulin heavy H chain isotypes in a teleost fish. J. Immunol., 141:1236-1245.
188. Logtenberg T. 1990. Properties of polyreactive natural antibodies to self and foreign antigenes. J. Clin. Immunol., 10:137-140.
189. Lumsden J.S., Ostland V.E., Byrne P.J., Ferguson H.W. 1993. Detection of a distinct gill-surface antibody response following horizontal infection and bath challenge of brook trout *Salvelinus fontinalis* with *Flavobacterium branchiophilum*, the causative agent of bacterial gill disease. Dis. Aquat. Org., 16:21-27.
190. Lumsden J.S., Ostland V.E., MacPhee D.D., Ferguson H.W. 1995. Production of gill-associated and serum antibody by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following immersion immunization with acetone-killed *Flavobacterium branchiophilum* and the relationship to protection from experimental challenges. Fish Shellfish Immunol., 5:151-165.
191. Lund V., Olafsen J.A. 1998. A comparative study of pentraxin-like proteins in different fish species. Dev. Comp. Immunol., 22:185-194.

192. Lunden T., Miettinen S., Lonnstrom L.G., Lilius E.-M., Bylund G. 1998. Influence of oxytetracycline and oxolinic acid on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol., 3:217-230.
193. Macouzet M., Simpson B.K., Lee B.H. 1999. Cloning of fish enzymes and other fish protein genes. Crit. Rev. Biotechnol., 19:179-196.
194. Magnadottir B. 1990. Purification of immunoglobulin from the serum of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Buvisindi. Icel. Agr. Sci., 4:49-54.
195. Magnadottir B., Gudmundsdottir B.K. 1992. A comparison of total and specific immunoglobulin levels in healthy Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and in salmon naturally infected with *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*. Vet. Immunol. Immunopathol., 32:179-189.
196. Magnadottir B. 1998. Comparison of immunoglobulin (IgM) from four fish species. Buvisindi, Icel. Agr. Sci., 12:51-63.
197. Magnadottir B. 1999. Humoral immune parameters of teleost fish. Ph.D. Thesis. Keldur, Iceland.
198. Magnadottir B., Jonsdottir H., Helgason S., Bjornsson B., Jorgensen T.O., Solem S.T., Pilstrom L. 1999a. Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). I. The effects of environmental temperature. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 122:173-180.
199. Magnadottir B., Jonsdottir H., Helgason S., Bjornsson B., Jorgensen T.O., Solem S.T., Pilstrom L. 1999b. Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus*



- morhua* L.). I. The effects of size and gender under different environmental conditions. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 122:181-188.
200. Magnadottir B., Jonsdottir H., Helgason S., Bjornsson B., Solem S.T., Pilstrom L. 2001. Immune parameters of immunised cod (*Gadus morhua* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 11:75-89.
201. Mahajan C.L., Dheer T.R. 1982. Regenerative capacity of the spleen in a splenectomized fish, *Channa punctatus* Bloch., with related investigations into changes in peripheral blood and haematopoietic tissues. *J. Fish Biol.*, 20:657-666.
202. Marchalonis J.J. 1971. Isolation and partial characterization of immunoglobulins of goldfish (*Carassius auratus*) and carp (*Cyprinus carpio*). *J. Immunol.*, 20:161-174.
203. Marchalonis J.J., Schluter S.F., Yang H.Y., McGee K., Yeaton L. 1992. Antigenic cross-reactions among immunoglobulin of diverse vertebrates (elasmobranchs to man) detected using xenoantisera. *Comp. Biochem. Physiol.*, 101A:675-687.
204. Matsunaga T., Rahman A. 1998. What brought the adaptive immune system to vertebrates? — The jaw hypothesis and the seahorse. *Immunol. Rev.*, 166:177-186.
205. Matsunaga T., Rahman A. 2001. In search of the origin of the thymus: the thymus and GALT may be evolutionary related. *Scand. J. Immunol.*, 53:1-6.
206. Maule A.G., Schreck C.B., Sharpe C. 1993. Seasonal changes in cortisol sensitivity and glucocorticoid receptor affinity and number in leukocytes of coho salmon. *Fish Physiol. Biochem.*, 10:497-506.
207. Melingen G.O., Steffanson S.O., Berg A., Wergeland h.I. 1995. Changes in serum protein and IgM concentration during smolting and early post-smolt period in

- vaccinated and unvaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Shellfish Immunol., 5:211-221.
208. Miller N.W., Sizemore R.C., Clem L.W. 1985. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for in vitro antibody responses of channel catfish leucocytes. J. Immunol., 134:2884-2888.
209. Miller N.W., Bly J.E., van Ginkel F., Ellsaesser F., Clem L.W. 1987. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: identification and separation of functionally distinct subpopulations of channel catfish lymphocytes with monoclonal antibodies. Dev. Comp. Immunol., 11:739-748.
210. Moody C.E., Serreze D.V., Reno P.W. 1985. Non-specific cytotoxic activity of teleost leukocytes. Dev. Comp. Immunol., 9:51-64.
211. Moore A.A., Eimers M.E., Cardella M.A. 1990. Attempt to control *Flexibacter columnaris* epizootics in pond-reared channel catfish by vaccination. J. Aquat. Anim. Health, 2:109-111.
212. Moore J.D., Ototake M., Nakanishi T. 1998. Particulate antigen uptake during immersion immunization of fish: the effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill. Fish Shellfish Immunol., 8:393-407.
213. Mor A., Avtalion A.A. 1990. Transfer of antibody activity from immunized mother to embryo in tilapias. J. Fish Biol., 37:249-255.
214. Morita N., Sano T. 1990. Regression effect of carp, *Cyprinus carpio* L., peripheral blood lymphocytes on CHV-induced carp papilloma. J. Fish Biol., 13:505-511.

215. Moyner K., Roed K.H., Sevatdal S., heum M. 1993. Changes in non-specific immune parameters in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., induced by *Aeromonas salmonicida* infection. Fish Shellfish Immunol., 3:253-265.
216. Murai T., Kodama H., Naiki M., Mikami T., Izawa H. 1990. Isolation and characterization of rainbow trout C-reactive protein. Dev. Comp. Immunol., 14:49-58.
217. Nakanishi T., Aoyagi K., Xia C., Dijkstra J.M., Ototake M. 1999. Specific cell-mediated immunity in fish. Vet. Immunol. Immunopathol., 72:101-109.
218. Nakanishi T., Ototake M. 1999. The graft-versus-host reaction (GVHR) in the ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. Dev. Comp. Immunol., 23:15-26.
219. Nakao M., Yano T. 1998. Structural and functional identification of complement components of the bony fish, carp (*Cyprinus carpio*). Immunol. Rev., 166:27-38.
220. Navarre O., Halver J.E. 1989. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. Aquaculture, 79:207-221.
221. Neumann N.F., Fagan D., Belosevic M. 1995. Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergies with bacterial lypopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. Dev. Comp. Immunol., 19:475-482.
222. Nikl L., Albright L.J., Evelyn T.P.T. 1991. Influence of seven immunostimulants on the immune response of coho salmon to *Aeromonas salmonicida*. Dis. Aquat. Org., 12:7-12.

223. Nonaka M., Yamaguchi N., Natsume-Sakai S., Takahashi M. 1981a. The complement system of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). I. Identification of the serum lytic system homologous to mammalian complement. J. Immunol., 126:1489-1494.
224. Nonaka M., Natsume-Sakai S., Takahashi M. 1981b. The complement system of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). II. Purification and characterization of the fifth component (C5). J. Immunol., 126:1495-1498.
225. Nonaka M., Fujii T., Kaidoh T., Natsume-Sakai S., Nonaka M., Yamaguchi N., Takahashi M. 1984. Purification of lamprey complement protein homologous to the third component of the mammalian complement system. J. Immunol., 133:3242-3249.
226. Obach A., Laurencin F.B. 1991. Vaccination of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* against the visceral form of coldwater disease. Dis. Aquat. Org., 12:13-15.
227. Obach A., Laurencin F.B. 1992. Effects of dietary oxidized fish oil and deficiency of anti-oxidants on the immune response of turbot, *Scophthalmus maximus*. PAMAQ IV: 4<sup>th</sup> Int. Colloquium on Patology in Marine Aquaculture, 107:221-228.
228. Obach A., Quentel C., Laurencin F.B. 1993. Effects of alfa-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax*. Dis. Aquat. Org., 15:175-185.
229. O'Halloran K., Ahokas J.T., Wright P.F.A. 1998. Response of fish immune cells to in vitro organotin exposures. Aquat. Toxicol., 40:141-156.

230. Ortuno J., Cuesta A., Angeles Esteban M., Meseguer J. 2001a. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. Vet. Immunol. Immunopathol., 79:167-180.
231. Ortuno J., Esteban M.A., Meseguer J. 2001b. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L) innate immune response. Fish Shellfish Immunol., 11:187-197.
232. Ototake M., Iwama G.K., Nakanishi T. 1996. The uptake of bovine serum albumin by the skin of bath-immunized trout *Oncorhynchus mykiss*. Fish Shellfish Immunol., 6:321-333.
233. Ottaviani E. 1991. Tissue distribution and levels of natural and induced serum lysozyme immunoreactive molecules in a freshwater snail. Tiss.Cell, 23:317-324.
234. Ourth D.D. 1980. Secretory IgM, lysozyme and lymphocytes in the skin mucus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Dev. Comp. Immunol., 4:65-74.
235. Ourth D.D., Ratts V.D., Parker N.C. 1991. Bactericidal complement activity and concentration of immunoglobulin M, transferrin, and protein at different ages of channel catfish. J. Aquat. Anim. Health, 3:274-280.
236. Park I.Y., Park C.B., Kim M.S., Kim S.C. 1998. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. FEBS Letters, 437:258-262.
237. Partula S., de Guerra A., Fellah J.S., Charlemagne J. 1995. Structure and diversity of the T cell antigen receptor  $\beta$ -chain in a teleost fish. J. Immunol., 155:699-706.

238. Paulsen S.M. 2000. Expression of lysozyme in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) — *in vivo* and *in vitro* studies. Ph.D. Thesis. Tromso, Norway.
239. Paulsen S.M., Engstad R.F., Robertsen B. 2000. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast  $\beta$ -glucan and bacterial lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.*, 11:23-37.
240. Pellegrini A., Thomas U., von Fellenberg R., Wild P. 1992. Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against Gram-negative and Gram-positive bacteria related to their basic character. *J. Applied Bacteriol.*, 72:180-187.
241. Piacentini S.C., Rohovec J.S., Fryer J.L. 1991. Epizootiology of erythrocytic inclusion body syndrome. *J. Aquat. Anim. Health*, 1:173-179.
242. Picchietti S., Terribili F.R., Mastrola L., Scapigliati G. Abelli L. 1997. Expression of lymphocyte antigenic determinants in developing gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Anat. Embryol.*, 196:457-463.
243. Plumb J.A., Areechon N. 1990. Effects of malathion on humoral immune response of channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.*, 14:355-358.
244. Rast J.P., Haire R.N., Litman R.T., Pross S., Litman G.W. 1995. Identification and characterization of T-cell antigen receptor-related genes in phylogenetically diverse vertebrate species. *Immunogenetics*, 42:204-212.
245. Regala R.P., Rice C.D., Schwedler T.E., Dorociak I.R. 2001. The effects of tributyltin (TBT) and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB-126) mixtures on antibody responses and phagocyte oxidative burst activity in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 40:386-391.

246. Rehulka J. 1993. Erythrodermatitis of carp, *Cyprinus carpio* (L.): an electrophoretic study of blood serum protein fraction levels. *Acta vet. Brno*, 60:187-197.
247. Ristow S.S., Deavila J.M., LaPatra S.E., Lauda K. 1993. Detection and characterization of rainbow trout antibody against infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 15:109-114.
248. Ristow S.S., Deavila J.M., Baldwin T.J., Wheeler P.A., Thorgaard G.H. 1996. Acceptance of skin grafts by isogenic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Vet. Res.*, 57:1576-1579.
249. Roberts M.L., Davies S.J., Pulsford A.L. 1995. The influence of ascorbic acid (vitamin C) on non-specific immunity in the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 5:27-38.
250. Rockey D.D., Shook L.A., Fryer J.L., Rohovec J.S. 1989. Salmonid serum inhibits haemolytic of the secreted haemolysin of *Aeromonas salmonicida*. *J. Aquat. Anim. Health.*, 1:263-268.
251. Rodgers C.J. 1991. The usage of vaccination and antimicrobial agents for control of *Yersinia ruckeri*. *Bact. Dis. Fish*, 14:291-301.
252. Roed K.H., Brun E., Larsen H.J., Refstie T. 1990. The genetic influence on serum haemolytic activity in rainbow trout. *Genetics in Aquaculture-III*, 85:109-117.
253. Roed K.H., Dehli A.K., Flengsrud R., Midthjell L., Rorvik K.A. 1995. Immunoassay and partial characterization of serum transferrin from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 5:71-80.

254. Romano N., Taverne-Thiele J.J., Maanen J.C., Rombout J.H.W.M. 1997a. Distribution of leukocyte subpopulations in developing carp (*Cyprinus carpio* L.): immunocytochemical studies. *Fish Shellfish Immunol.*, 7:439-453.
255. Romano N., Abelli L., Mastrola L., Scapigliati G. 1997b. Immunocytochemical detection and cytomorphology of lymphocyte subpopulations in a teleost fish *Dicentrarchus labrax* (L.). *Cell. Tissue Res.*, 289:163-171.
256. Rombout J.H.W.M., Van-den Berg A.A., Van-den Berg C.T.G.A., Witte P., Egberts E. 1989. Immunological importance of the second gut segment of carp. 3. Systemic and/or mucosal immune responses after immunization with soluble or particulate antigen. *J. Fish Biol.*, 35:179-186.
257. Rombout J.H.W.M., Taverne N., Van-De-Camp M., Taverne-Thiele A.J. 1993a. Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.*, 17:309-317.
258. Rombout J.H.W.M., Taverne-Thiele J.J., Villena M.I. 1993b. The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): an immunocytochemical study. *Dev. Comp. Immunol.*, 17:55-66.
259. Rombout J.H.W.M., Van de Wal J.W., Companjen A., Taverne N., Taverne-Thiele J.J. 1997. Characterization of a T cell lineage marker in carp *Cyprinus carpio* L. *Dev. Comp. Immunol.*, 21:35-46.
260. Rombout J.H.W.M., Joosten P.H.M., Engelsma M.Y., Vos N., Taverne N., Taverne-Thiele J.J. 1998. Indication of a distinct putative T cell population in mucosal tissue of carp. *Dev. Comp. Immunol.*, 22:63-77.



261. Roubal F.R. 1986. Blood and other possible inflammatory cells in the sparid *Acanthopagrus australis* (Gunter). J. Fish Biol., 28:573-593.
262. Rumfelt L.L., Avila D., Diaz M., Bartl S., McKinney E.C., Flajnik M.F. 2001. A shark antibody heavy chain encoded by a nonsomatically rearranged VDJ is preferentially expressed in early development and is convergent with mammalian IgG. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:1775-1780.
263. Sakai M., Kamiya H., Ishii S., Atsuta S., Kobayashi M. 1992. The immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus myliss*. In: Shariff M., Subasighe R.P., Arthur J.R. (Eds.). Diseases in Asian Aquaculture. V. 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 413-417.
264. Sakai M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture, 172:63-92.
265. Sanchez C., Dominguez J. 1991. Trout immunoglobulin populations differing in light chains revealed by monoclonal antibodies. Mol. Immunol., 28:1271-1277.
266. Sanchez C., Lopez-Fierro P., Zapata A., Dominguez J. 1993. Characterization of monoclonal antibodies against heavy and light chains of trout immunoglobulins. Fish Shellfish Immunol., 3:237-251.
267. Sanchez C., Alvarez A., Castillo A., Zapata A., Villena A., Dominguez J. 1995. Two different subpopulations of Ig-bearing cells in lymphoid organs of rainbow trout. Dev. Comp. Immunol., 19:79-86.
268. Santos Y., Bandin I., Nunez S., Gravningen K., Toranzo A.E. 1991. Protection of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*

- (Richardson), against vibriosis using two different vaccines. *Bact. Dis. Fish*, 14:407-411.
269. Scapigliati G., Mazzini M., Mastrolia L., Romano N., Abelli L. 1995. Production and characterization of a monoclonal antibody against the thymocytes of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) (Teleostea, Percichthyidae). *Fish Shellfish Immunol.*, 5:393-405.
270. Scapigliati G., Romano N., Abelli L. 1999a. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes. *Aquaculture*, 172:3-28.
271. Scapigliati G., Scalia D., Marras A., Meloni S., Mazzini M. 1999b. Immunoglobulin levels in the teleost sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) in relation to age, season, and water oxygenation. *Aquaculture*, 174:207-212.
272. Schreck C.B., Maule, A.G., Slater, C.H. 1991. Stress affects the immune response and health of fish in aquacultural systems. In: Program and Abstracts of the Second IMBC'91, p. 58.
273. Schwaiger J., Bucher F., Ferling H., Kalbfus W., Negele R. 1992. A prolonged toxicity study on the effects of sublethal concentration of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO): histopathological and histochemical findings in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, 23:31-48.
274. Sealey W.M., Lim C., Klesius P.H. 1997. Influence of the dietary level of iron from iron methionine and iron sulfate on immune response and resistance of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. *J. World Aquat. Soc.* 28:142-149.

275. Secombes C.J., Manning M.J., Ellis A.E. 1982. The effect of primary and secondary immunization of the lymphoid tissues of the carp, *Cyprinus carpio* L. J. Exp. Zool., 220:277-287.
276. Secombes C.J., Hardie L.J., Daniels G.D. 1996. Cytokines in fish: an update. Fish Shellfish Immunol., 6:291-304.
277. Secombes C.J., Zou J., Hardie L.J., Laing K.J., Daniels G.D., Cunningham C. 1997. Rainbow trout cytokine genes. Dev. Comp. Immunol., 21:138.
278. Secombes C.J., Zou J., Laing K., Daniels G.D., Cunningham C. 1999. Cytokine genes in fish. Aquaculture, 172:93-102.
279. Seeley K.R., Weeks-Perkins B.A. 1991. Altered phagocytic activity of macrophages in oyster toadfish from a highly polluted subestuary. J. Aquat. Anim. Health, 3:224-227.
280. Sharp G.J.E., Pike A.W., Secombes C.J. 1992. Sequential development of the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)) to experimental plerocercoid infections of *Diphyllbothrium dendriticum* (Nitzsch, 1824). Parasitology, 104:169-178.
281. Sheldon W.M.Jr., Blazer V.S.TI. 1991. Influence of dietary lipid and temperature on bactericidal activity of channel catfish macrophages. J. Aquat. Anim. Health, 3:87-93.
282. Shelton E., Smith M. 1970. The ultrastructure of carp (*Cyprinus carpio*) immunoglobulin: a tetrameric macroglobulin. J. Mol. Biol., 54:615-617.

283. Sin Y.M., Ling K.H., Lam T.J. 1994. Passive transfer of protective immunity against ichthyophthiriasis from vaccinated mother to fry in tilapias, *Oreochromas aureus*. *Aquaculture*, 120:229-237.
284. Siwicki A.K. 1989. Immunostimulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp. Immunol.*, 13:87-91.
285. Siwicki A.K., Cossarini-Dunier M., Studnicka M., Demael A. 1990. In vivo effect of the organophosphorus insecticide trichlorphon on immune response of carp (*Cyprinus carpio*): Effect of high doses of trichlorphon on nonspecific immune response. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 19:99-105.
286. Siwicki A.K., Anderson D.P., Rumsey G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 41:125-139.
287. Smith S.A., Gebhard D.H., Housman J.M., Levy M.G., Noga E.J. 1993. Isolation, purification, and molecular-weight determination of serum immunoglobulin from *Oreochromis aureus*. *J. Aquat. Anim. Health*, 5:23-25.
288. Somamoto T., Nakanishi T., Okamoto N. 2000. Specific cell-mediated cytotoxicity against a virus-infected syngeneic cell line in isogeneic ginbuna crucian carp. *Dev. Comp. Immunol.*, 24:633-640.
289. Sonzogni W., Maack L., Gibson T., Degenhardt D., Anderson H., Fiore B. 1991. Polychlorinated biphenil congeners in blood of Wisconsin sport fish consumers. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 20:56-60.

290. Starkey P.M., Barrett A.J. 1982. Evolution of  $\alpha_2$ -macroglobulin. The structure of a protein homologous with human  $\alpha_2$ -macroglobulin from plaice (*Pleuronectes platessa* L.) plasma. *Biochem. J.*, 205:105-115.
291. Stave J.W., Roberson B.S. 1985. Hydrocortisone suppresses the chemiluminescent response of striped bass phagocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 9:77-84.
292. Steine N.O., Melingen G.O., Wergeland H.I. 2001. Antibodies against *Vibrio salmonicida* lipopolysaccharide (LPS) and whole bacteria in sera from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated during the smolting and early post-smolt period. *Fish Shellfish Immunol.*, 11:39-52.
293. Stevens A., Lowe J. 1993. *Histology*. Mosby, London, England.
294. Stevenson R.M. 1997. Immunization with bacterial antigens: yersiniosis. *Dev. Biol. Stand.*, 90:117-124.
295. Stuge T.B., Wilson M.R., Zhou H., Barker K.S., Bengten E., Chinchar G., Miller N.W., Clem L.W. 2000. Development and analysis of various clonal alloantigen-dependent cytotoxic cell lines from channel catfish. *J. Immunol.*, 164:2971-2977.
296. Sunyer, J.O., Tort L. 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 45:333-345.
297. Sunyer, J.O., Tort L., Lambris J.D. 1997. Diversity of the third form of complement, C3, in fish: functional characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*. *Biochem. J.*, 326:877-881.

298. Sunyer J.O., Zarkadis I.K., Lambris J.D. 1998. Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? *Immunol. Today*, 19:519-523.
299. Szalai A.J., Norcum M.T., Bly J.E., Clem L.W. 1992. Isolation of an acute-phase phosphorylcholine-reactive pentraxin from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 102B:535-543.
300. Takada K., Ohno N., Yadomae T. 1994. Detoxification of lipopolysaccharide (LPS) by egg white lysozyme. *FEMS Immunol. Medical Microbiol.*, 9:255-263.
301. Tate H., Kodama H., Izawa H. 1990. Immunosuppressive effect of infectious pancreatic necrosis virus on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Jap. J. Vet. Sci.*, 52: 931-937.
302. Tatner M.F. 1985. The migration of labelled thymocytes to the peripheral lymphoid organs in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Dev. Comp. Immunol.*, 9:85-91.
303. Tatner M.F. 1986. The ontogeny of humoral immunity in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12:93-105.
304. Tatner M.F. 1990. Quantitative and qualitative differences in antibodies produced by immunosuppressed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 88:205-211.
305. Thiry M., Dheur I., Xhonneux F., Margineanu I., Dommes J., Vanderheijden N., Rossius M., Kinkelin P., Renard A. 1991. Vaccination against fish rhabdovirus: Recent advances. 2<sup>nd</sup> Int. Mar. Biotechnol. Conference IMBC'91, 56.

306. Thomas P.T., Woo P.T.K. 1990. Dietary modulation of humoral immune response and anaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), infected with *Cryptobia salmositica* Katz, 1951. J. Fish Dis., 13:435-446.
307. Thuvander A. 1989. Cadmium exposure of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: Effects on immune functions. J. Fish Biol., 35:521-529.
308. Tsuda T., Nakanishi H., Aoki S., Takebayashi J. 1988. Bioconcentration and metabolism of butyltin compounds in carp. Water Res., 22:647-651.
309. Vallejo A.N., Miller N.W., Clem L.W. 1992. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. Ann. Rev. Fish Dis., 2:73-89.
310. Van Ginkel F.W., Pascual D.W., Clem L.W. 1991. Proteolytic fragmentation of channel catfish antibodies. Dev. Comp. Immunol., 15:41-51.
311. Van Muiswinkel W.B., Lamers C.H.J., Rombout J.H.W.M. 1991. Structural and functional aspects of the spleen in bony fish. Res. Immunol., 142:362-366.
312. Velji M.I., Albright L.J., Evelyn T.P.T. 1990. Protective immunity in juvenile coho salmon *Oncorhynchus kisutch* following immunisation with *Vibrio ordalii* lipopolysacchride or from exposure to live *V. ordalii* cells. Dis. Aquat. Org., 9:25-29.
313. Velji M.I., Evelyn T.P.T., Albright L.J. 1991. Nature of immune response in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* following vaccination with *Vibrio ordalii* lipopolysacchride by two different routes. Dis. Aquat. Org., 11:79-84.

314. Verburg-van Kemenade L.B.M., Groeneveld A., Van Rens B.T.T.M., Rombout J.H.W.M. 1994. Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*). J. Exp. Biol., 187:143-158.
315. Verburg-van Kemenade L.B.M., Weyts F.A.A., Debets R., Flik G. 1995. Carp macrophages and neutrophilic granulocytes secrete an interleukin-1-like factor. Dev. Comp. Immunol., 19:59-70.
316. Vinitnantharat S., Plumb J.A. 1992. Kinetics of the immune response of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. J. Aquat. Anim. Health, 4:207-214.
317. Vinitnantharat S., Plumb J.A. 1993. Protection of channel catfish *Ictalurus punctatus* following natural exposure to *Edwardsiella ictaluri* and effects of feeding antigen on antibody titer. Dis. Aquat. Org., 15:31-34.
318. Voss E.W., Groberg W.J., Fryer J.L. 1980. Metabolism of Coho salmon Ig. Catabolic rate of Coho salmon tetrameric Ig in seru,. Mol. Immunol., 17:445-452.
319. Waterstrat P.R., Ainsworth A.J., Capley G. 1991. In vitro responses of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, neutrophils to *Edwardsiella ictaluri*. Dev. Comp. Immunol., 15:53-63.
320. Wilson R.P., Fowlkes P.L. 1976. Activity of glutamine synthetase in channel catfish tissues determined by an improved tissue assay method. Comp. Biochem. Physiol., 54B:365-368.
321. Wilson M., Bengten E., Miller N.W., Clem L.W., Du Pasquier L., Warr G.W. 1997. A novel chimeric Ig heavy chain from teleost fish shares similarities to IgD. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4593-4597.



322. Wilson M., Zhou H., Bengten E., Clem L.W., Stuge T.B., Warr G.W., Miller N.W. 1998. T-cell receptors in channel catfish: structure and expression of TCR  $\alpha$  and  $\beta$  genes. *Mol. Immunol.*, 25:545-557.
323. Woo P.T.K., Li Sen. 1990. In vitro attenuation of *Cryptobia salmositica* and its use as a live vaccine against cryptobiosis in *Oncorhynchus mykiss*. *J. Parasitol.*, 76:750-755.
324. Yada T., Azuma T., Takagi Y. 2001. Stimulation of non-specific immune functions in seawater-acclimated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, with reference to the role of growth hormone. *Comp. Biochem. Physiol.: B Biochem. Mol. Biol.*, 129:695-701.
325. Yamamoto K., Mukamoto M., Watarai S., Kodama H., Nakayasu C., Okamoto N. 2001. Induction of specific cytotoxic T-cell activity against xenogeneic target cells in carp (*Cyprinus carpio*). *Am. J. Vet. Res.*, 62:599-603.
326. Yano T., Matsuyama H., Mangindaan R.E.P. 1991. Polysaccharide-induced protection of carp, *Cyprinus carpio* L., against bacteria injection. *J. Fish Dis.*, 14:577-582.
327. Zapata A. 1979. Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Dev. Comp. Immunol.*, 3:55-65.
328. Zapata A. 1980. Ultrastructure of Elasmobranch lymphoid tissue. I. Thymus and spleen. *Dev. Comp. Immunol.*, 4:459-472.

329. Zelicoff JT., Raymond A., Carlson E., Li Y., Beaman J.R., Anderson M. 2000. Biomarkers of immunotoxicity in fish: from the lab to the ocean. *Toxicol. Lett.*, 112-113:325-331.