

- Ин-т физкультуры Гос. комитета по делам
физкультуры и спорта, Львов
Киев. науч.-исслед. ин-т отоларингологии
им. проф. А. И. Коломийченко М-ва здравоохранения

Влияние рабдовируса на гематологические, иммунологические и биохимические показатели холоднокровных животных в эксперименте

В связи с этим, цель нашей работы — исследование морфометрических, иммунологических и биохимических параметров у карпов после экспериментального воздействия на них вирулентным штаммом рибовируса — возбудителя весенней виремии карпов.

Объектом исследования служили годовики украинского рамчатого карпа (20 экз.), выращенные в рыбхозе «Нивка» Киевской области. Рыбоводно-биологический статус рыб оценивали по длине, массе тела, коэффициенту упитанности, определяемому по Фультону [8]. Карпов, разделенных на опытную и контрольную группы, содержали в бетонных

94

бассейнах при те
го комплекса орг
риментом рыbam
Карпам опытной
культуральную
КТ-120б, 34-й па
лучали такую же
Спустя 10 су
ляли: БАСК — п
лизосима — мето
воротке — с по
ной формулы на
200 лейкоцитов, 1
[4, 5]. Кроме то
ределяли продол
соотношение, а т
ядерный индекс.
Ферментативн
рыб устанавливал
и Кунитца [6] с
мы «Hitachi». Д
Стьюдента.

Анализ рыбоводн
10-е сутки после
рой видно, что до
ти между ними н
биологические по
ны в качестве кр
людаются в лате
Определение
крови показало,
БАСК и почти в
фициент вариаци
достоверно умень
венно повысить Б
об их устойчивос
основании данны
ние БАСК вследс
большой части дв

Длина тела, см
 $M \pm m$
 $S_y \pm S_{Cy}$
 лимиты

Масса тела, г
 $M \pm m$
 $S_y \pm S_{Cy}$
 лимиты

Коэффициент упитанности
 $M \pm m$
 $S_y \pm S_{Cy}$
 лимиты

Примечания: здесь
ка; число карпов в ка

Физиол. журн., 1991,

бассейнах при температуре 15—17 °С. Для адаптации ферментативно-го комплекса органов пищеварения в течение двух недель перед экспериментом рыбам скормливали комбикорм (рецепт К-Ш-3/22 Укр.). Карпам опытной группы внутрибрюшинно вводили вируссодержащую культуральную жидкость (2 мл/особь, Rhabdovirus carpio, штамм КТ-1206, 34-й пассаж, титр Ig 7,5 ТЦД₅₀/мл). Контрольные рыбы получали такую же дозу культуральной жидкости без вируса.

Спустя 10 сут после введения вируса у рыб обеих групп определяли: БАСК — по методу Смирновой и Кузьминой [10], содержание лизоцима — методом диффузии в агаре, содержание белка в сыворотке — с помощью рефрактометра. Для вычисления лейкоцитарной формулы на мазках, окрашенных по Паппенгейму, просматривали 200 лейкоцитов, идентифицируя их согласно классификации Ивановой [4, 5]. Кроме того, на каждом мазке крови для 100 эритроцитов определяли продольный и поперечный размеры диаметра, вычисляли их соотношение, а также площадь ядра и клетки, учитывали клеточно-ядерный индекс.

Ферментативную активность гепатопанкреаса и кишечной слизи рыб устанавливали с помощью модифицированной методики Нортропа и Кунитца [6] с использованием аминокислотного анализатора фирмы «Hitachi». Достоверность различий определяли по критерию t Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Анализ рыбоводно-биологических параметров карпов обеих групп на 10-е сутки после инокуляции вируса представлен в табл. 1, из которой видно, что достоверных различий длины, массы тела и упитанности между ними нет. Этот факт может указывать на то, что рыбоводно-биологические показатели в данном случае не могут быть использованы в качестве критерия тех изменений в организме рыб, которые наблюдаются в латентный период вирусной болезни.

Определение содержания белка, БАСК и лизоцима в сыворотке крови показало, что у карпов, получавших вирус, на 33 % возрастает БАСК и почти в 3 раза снижается ее вариабельность (табл. 2). Коэффициент вариации содержания лизоцима у рыб опытной группы также достоверно уменьшается. Тот факт, что годовики карпа смогли существенно повысить БАСК в ответ на инокуляцию вируса, свидетельствует об их устойчивости к этому патогену. Такой вывод напрашивается на основании данных, полученных нами ранее, где показано, что снижение БАСК вследствие вирусемии приводит рано или поздно к гибели большей части двухлетков карпа [15].

Таблица 1. Рыбоводно-биологическая характеристика годовиков карпа через 10 сут после введения рбдовируса

Показатель	Интактные карпы (контроль)	Карпы после введения вируса
Длина тела, см		
$M \pm m$	14,5 ± 0,2	15,2 ± 0,4
$Cy \pm Scy$	4,2 ± 0,9	8,1 ± 1,8
лимиты	13,5—15,5	13,0—17,0
Масса тела, г		
$M \pm m$	97,0 ± 0,2	102,5 ± 2,8
$Cy \pm Scy$	6,9 ± 1,6	8,7 ± 2,0
лимиты	90,0—105,0	90,0—115,0
Коэффициент упитанности (по Фультону)		
$M \pm m$	3,2 ± 0,1	2,9 ± 0,2
$Cy \pm Scy$	8,7 ± 1,9	16,6 ± 3,8
лимиты	2,8—3,6	2,7—4,1

Примечания: здесь и далее в таблицах $Cy \pm Scy$ — коэффициент вариации и его ошибка; число карпов в каждой группе составляет 10.

Морфометрический анализ эритроцитов также оказался полезным для регистрации изменений, происходящих в организме карпов в результате инокуляции вируса. Как видно из табл. 3, у карпов опытной группы наблюдаются уменьшение малого диаметра ядра и клетки и увеличение большого диаметра ядра, а также отчасти клетки в целом. Это приводит к увеличению значения показателя эксцентриситета и уменьшению площади эритроцита. На указанном фоне обнаружено возрастание вариабельности диаметров ядра и клетки, а также площади эритроцита. Отсюда можно предположить, что у не заболевших после введения вируса рыб не появляются в крови в большом количестве округлые, т. е. молодые, формы эритроцитов, столь характерные для завершающей стадии инфекционного процесса [1].

Таблица 2. Содержание неспецифических факторов иммунитета у годовиков карпа через 10 сут после введения вируса

Показатель	Интактные карпы (контроль)	Карпы после введения вируса
Массовая доля, % белка		
М±m	0,397±0,081	0,544±0,091
Су±Scy	65,2±19,8	52,9±14,8
Лизоцим		
М±m	4,331±2,172	2,781±1,180
Су±Scy	58,6±7,1*	34,2±6,4*
Бактерицидная активность сыворотки крови, %		
М±m	54,22±5,404**	72,19±2,992**
Су±Scy	31,5±7,7*	13,1±2,9*

Примечание. Здесь и далее в таблицах * P<0,05; ** P<0,90; *** P<0,99.

Таблица 3. Морфометрический анализ эритроцитов крови карпов через 10 сут после введения вируса

Показатель	Интактные карпы		Карпы после введения вируса	
	М±m	Су±Scy	М±m	Су±Scy
Большой диаметр, мкм:				
клетки	11,3±0,09	8,7±0,6*	11,1±0,12	10,9±0,78*
ядра	4,4±0,05	11,9±0,8**	4,6±0,07*	16,4±1,19**
Малый диаметр, мкм:				
клетки	9,3±0,09***	10,6±0,7	7,9±0,12***	14,7±1,06*
ядра	3,2±0,04***	13,4±0,9	2,9±0,05***	16,3±1,18
Площадь, мкм²:				
клетки	111,7±1,29***	11,5±0,8*	98,7±1,49***	15,6±1,09*
ядра	28,7±0,73	8,0±1,8	28,2±0,69	7,7±1,74
Отношение площади клетки к площади ядра	3,9		3,5	

Подсчет лейкоцитов не дал ожидаемых результатов. Как видно из табл. 4, относительное содержание лимфоцитов у рыб обеих групп было одинаковым. Правда, под влиянием вируса вариабельность относительного числа этих клеток увеличилась в 2 раза. Почти в 3 раза возросла доля палочкоядерных нейтрофилов. По остальным группам лейкоцитов различий между карпами опытной и контрольной групп не обнаружено. Возможно, более дифференцированный подсчет клеток с учетом доли различных популяций лимфоцитов в дальнейшем позволит обнаружить изменения, происходящие в организме рыб, подвергнутых воздействию вирусом.

Заслуживают внимания результаты биохимического анализа активности пищеварительных ферментов у рыб обеих групп. В табл. 5

Таблица 4. Лейкоциты карпа после введения вируса

Группа лейкоцитов
Лимфоциты
Палочкоядерные нейтрофилы
Сегментоядерные нейтрофилы
Метамиелоциты нейтрофильные
Базофилы и псевдобазофилы
Эозинофилы
Моноциты
Пенистые клетки

Таблица 5. Содержание аминокислот в сыворотке крови карпа после введения вируса

Аминокислота
Треонин
Валин
Метионин
Изолейцин
Лейцин
Фенилаланин
Лизин
Гистидин
Аргинин
Аспаргин
Серин
Аланин
Тирозин
Пролин
Глицин
Глутамин К
Сумма аминокислот

представлены результаты анализа содержания аминокислот в сыворотке крови карпа после введения вируса. При анализе контрольной группы в меньшей мере 12 аминокислот, в опытной же группе в 2-3 раза возросло содержание палочкоядерных нейтрофилов. По остальным группам лейкоцитов различий между карпами опытной и контрольной групп не обнаружено. Возможно, более дифференцированный подсчет клеток с учетом доли различных популяций лимфоцитов в дальнейшем позволит обнаружить изменения, происходящие в организме рыб, подвергнутых воздействию вирусом.

Таблица 4. Лейкоцитарная формула годовиков карпа через 10 сут после введения рабдовируса

Группа лейкоцитов	Интактные карпы		Карпы после введения вируса	
	M±m	Cy±Scy	M±m	Cy±Scy
Лимфоциты	85,2±1,2	4,6±1,0*	85,5±2,8	10,5±2,4*
Палочкоядерные нейтрофилы	0,5±0,2*	4,5±3,9	1,4±0,3*	8,0±2,2
Сегментоядерные нейтрофилы	1,2±0,5	4,7±4,6	1,5±0,3	8,7±2,4
Метамиелоциты нейтрофильные	9,5±1,1	3,6±3,1	6,9±1,4	6,5±1,8
Базофилы и псевдобазофилы	0,5±0,1	0,3±0,2	0,7±0,3	1,8±0,8
Эозинофилы	0,2±0,1	0,8±0,4	0,2±0,1	2,4±0,7
Моноциты	1,9±0,3	2,6±0,6	2,8±0,8	8,7±3,0
Пенистые клетки	1,2±0,3	7,0±0,7	1,0±0,4	5,4±0,4

Таблица 5. Содержание свободных аминокислот в корме до и после его инкубирования с ферментными вытяжками из гепатопанкреаса и слизистой оболочки кишечника карпа контрольной и опытной групп, нг

Аминокислота	До инкубации	После инкубации			
		Ферменты рыб, не инфицированных рабдовирусом (контроль)		Ферменты рыб, инфицированных рабдовирусом (опыт)	
		n	M±m	n	M±m
Треонин	24,7	10	252,8±55,0*	10	473,0±77,2*
Валин	20,2	7	113,3±24,7	10	160,5±37,1
Метонин	Не обнар.	6	29,8±8,9***	10	46,4±12,9***
Изолейцин	11,1	6	68,7±26,5	10	98,0±22,1
Лейцин	18,7	7	98,0±32,7	9	157,0±42,2
Фенилаланин	73,4	4	135,9±20,9	6	246,3±96,8
Лизин	22,3	5	71,6±16,2	8	115,6±71,7
Гистидин	9,4	7	42,7±9,6	10	47,9±11,8
Аргинин	108,1	9	242,2±25,9	10	341,1±56,9
Аспаргин	54,2	10	55,9±6,3***	10	90,0±7,8***
Серин	29,4	8	56,0±15,4	10	76,5±17,1
Аланин	40,1	8	101,7±21,5	10	128,2±21,5
Тирозин	20,2	4	27,7±8,5	6	50,4±17,4
Пролин	Не обнар.	10	126,4±11,3	10	178,3±20,7
Глицин	22,5	8	23,8±4,7	10	23,5±4,6
Глутамин К	114,3	5	32,1±12,3	5	52,0±19,7
Сумма аминокислот	596,7		1184,2±283,7		2118,9±385,36

представлены результаты определения содержания свободных аминокислот в корме после его гидролиза с вытяжками из гепатопанкреаса и слизистой оболочки кишечника рыб опытной и контрольной групп. При анализе контрольной группы рыб показано, что содержание по меньшей мере 12 аминокислот после ферментативного воздействия в субстрате корма достоверно увеличивается. Исключение составляют такие аминокислоты, как аспаргин, тирозин и глицин, содержание которых не изменяется, а также глутамин, содержание которого, напротив, существенно уменьшается. Однако наибольший интерес в контексте этой работы представляют результаты сопоставления массы (нг) свободных аминокислот в корме после инкубации его с пищеварительными ферментами рыб разных групп. Установлено, что под влиянием вируса у карпов возрастает ферментативная активность, и в субстрате корма достоверно увеличивается масса таких аминокислот, как треонин, метионин и аспаргин. Кроме того, суммарная масса всех аминокислот также возрастает почти в 2 раза. Исключение составляет глутамин.

тамин, содержание которого у рыб контрольной группы уменьшается в 3 раза, тогда как в опытной — только в 2 раза. Результаты анализа ферментативной активности, о которой можно судить по образованию в перевариваемом корме различных свободных аминокислот, показывают с очевидностью, что при инокуляции вируса у рыб наблюдается стимуляция деятельности пищеварительных ферментов. При этом часть свободных аминокислот может вовлекаться в синтез белка. Свидетельством этого служит более высокое содержание сывороточных белков у рыб опытной группы по сравнению с карпами контрольной группы (см. табл. 2). Можно было бы предположить, что избыток аминокислот связан с обеспечением репликации вирусных частиц, но, поскольку заболевания не произошло, кажется более вероятным рассматривать факт повышения их содержания как компенсаторную реакцию организма рыб в ответ на воздействие вирусом. Если последнее верно, то открывается заманчивая перспектива профилактики вирусных инфекций рыб скормливанием им специальных смесей с повышенным содержанием свободных аминокислот в соответствии с тем соотношением, которое показано нами в опытах *in vitro*.

Оценивая результаты опыта в целом, можно прийти к выводу, что использованный методический подход к изучению изменений, возникающих в организме рыб под действием вируса, оказывается полезным. С учетом полученных результатов и данных, опубликованных ранее, представляется возможным прогнозировать исход контакта карпов с вирусом по БАСК. Для рыб, у которых БАСК на 10-е сутки после инокуляции вируса падает, вероятность возникновения заболевания возрастает. При очень низких значениях БАСК летальный исход для большей части таких особей очевиден. Если у карпов в результате их контакта с вирусом БАСК не только не снижается, а даже возрастает, исход инфицирования становится относительно благополучным.

Не меньший практический интерес представляют результаты биохимического анализа, касающиеся повышения активности пищеварительных ферментов и, как следствие этого, — повышения содержания свободных аминокислот в химусе в опытах с карпами после их контакта с вирусом. В этом случае отметим известную роль аминокислот в синтезе белков и репарации. Но, наряду с этим, имеются рекомендации по использованию набора аминокислот для обработки икры в момент ее оплодотворения с целью повышения выживаемости эмбрионов карпов [11]. Кроме того, показано, что аминокислоты могут выступать в роли иммуностимуляторов. В частности, аргинин у теплокровных усиливает фагоцитарную активность нейтрофилов, а аспарагиновая кислота повышает продукцию антител [3]. С учетом результатов наших опытов и исходя из указанных сообщений, можно предположить, что у рыб существует своеобразный естественный механизм повышения выживаемости, заключающийся в накоплении свободных аминокислот и их использовании для регуляции синтеза белков. Этот механизм, по-видимому, включается сразу после контакта рыб с патогеном и, при наличии пищи в достаточном количестве, обеспечивает на первых порах надлежащую резистентность. Поэтому необходимы, с одной стороны, тщательное изучение неспецифических механизмов противoinфекционной защиты рыб, а с другой, — разработка специальных лечебных кормовых смесей с повышенным содержанием ряда свободных аминокислот, состав которых может зависеть от специфики патогена, вида рыб, возраста и других факторов.

Выводы

1. У годовиков карпа спустя 10 сут после инокуляции рибовируса при отсутствии клинических признаков виремии возрастает БАСК, относительное число палочкоядерных нейтрофилов и увеличивается показатель эксцентриситета эритроцитов.

2. За указ
русом, наблюд
ментов и, как
лот, содержа
ных рыб.

3. Высокие
достаточное со
по-видимому,
резистентность

Yu. D. Temnikhanov

EFFECT OF RNA
BIOCHEMICAL I

Bactericidal activit
recorded as well a
results of free ami
after rhabdovirus i
symptoms of virem
of excentricitet ind
of digestive enzym
her than that in th
expediency to be u
infections.

I. I. Schmalhausen
Academy of Scienc

СПИСОК ЛИТЕРА

1. Балахнин И. А. метрический анал
на завершающ
№ 6. — С. 105—
2. Балахнин И. А. ких показателе
35, № 4. — С. 44
3. Белокрылов Г. лядторы иммуно
4. Иванова Н. Т. ин-т, 1970. — 18
5. Иванова Н. Т.
6. Нортроп Д., иностр. лит., 19
7. Осадчая Е. Ф., русно-бактериа
8. Правдин И. Ф.
9. Рудиков Н. И. Ихтиология. — 1
10. Смирнова О. В. крови методом мунологии. — 19
11. А. с. 1340696 (рыб / В. П. Бил
12. Ahne W. Uptake J. Fish Diseases.
13. George W. Nac zyme-like enzym P. 204—221.
14. Roberts R. J., S Parey. — 1985.
15. Temnikhanov Y. tebrates / Eds. W

Ин-т зоологии им.
АН УССР, Киев

2. За указанный период у годовиков карпа, зараженных рабдовирусом, наблюдаются повышенная активность пищеварительных ферментов и, как следствие, образование в химусе свободных аминокислот, содержание которых превышает таковое, наблюдаемое у интактных рыб.

3. Высокие БАСК и ферментативная активность, обеспечивающая достаточное содержание свободных аминокислот у зараженных карпов, по-видимому, входят в комплекс защитных механизмов, повышающих резистентность таких рыб к инфекции.

Yu. D. Temnikhanov, V. D. Rekrut, I. A. Balakhnin, A. I. Latysh

EFFECT OF RHABDOVIRUS ON THE HEMATOLOGICAL, IMMUNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL INDICES OF COLD-BLOODED ANIMALS IN THE EXPERIMENT

Bactericidal activity of blood serum (BABC), content of lysozyme, protein in it were recorded as well as formula and form of erythrocytes, activity of digestive enzymes by results of free amino acid accumulation in the food substrate were determined ten days after rhabdovirus injection to one-year-old carp. It is shown that if there are no clinical symptoms of viremia in carps, BABC, relative number of stab neutrophils and the value of excentricitet index in erythrocytes increase. Simultaneously stimulation of the activity of digestive enzymes and formation of free amino acids in chyme whose content is higher than that in the intact fish are observed in such fish. Free amino acids are discussed for expediency to be used as an additive to the fodder for increasing resistivity of fish to infections.

I. I. Schmalhausen Institute of Zoology,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Балахнин И. А., Заводникова Н. С., Темниханов Ю. Д., Литвиненко В. В. Морфометрический анализ эритроцитов и уровень антивирусных антител в крови карпов на завершающем этапе инфекционного процесса // Физиол. журн.— 1988.— 34, № 6.— С. 105—107.
2. Балахнин И. А., Гуньковский С. А., Давыдов О. Н. и др. Динамика иммунологических показателей у карпов при воздействии метиленовым синим // Там же.— 1989.— 35, № 4.— С. 44—52.
3. Белокрылов Г. А., Молчанова И. В., Сорочинская Е. И. Аминокислоты как стимуляторы иммуногенеза // Докл. АН СССР.— 1986.— 286, № 2.— С. 471—473.
4. Иванова Н. Т. Материалы к морфологии крови рыб.— Ростов н/Д: Ростов. пед. ин-т, 1970.— 184 с.
5. Иванова Н. Т. Атлас клеток крови рыб.— М.: Легк. и пищ. пром-сть. 1982.— 184 с.
6. Нортрон Д., Кунитц М., Херриот Р. Кристаллические ферменты.— М.: Изд-во иностр. лит., 1950.— 346 с.
7. Осадчая Е. Ф., Просяня В. В., Руденко А. П. Краснуха карпа — комплексная вирусно-бактериальная болезнь // Рыбн. х-во.— 1977.— № 6.— С. 31—33.
8. Правдин И. Ф. Руководство по изучению рыб.— М.: Пищ. пром-сть, 1966.— 376 с.
9. Рудиков Н. И. Вирусы и вирусные болезни рыб // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Ихтиология.— 1985.— 1.— С. 6—92.
10. Смирнова О. В., Кузьмина Т. А. Определение бактерицидной активности сыворотки крови методом фотонейфелометрии // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.— 1966.— № 4.— С. 8—11.
11. А. с. 1340696 (СССР) 01 К 61/100. Способ повышения жизнеспособности карповых рыб / В. П. Билько, В. Н. Жукинский, Л. А. Сиренко.— Оpubл. в Б. И., 1987, № 36.
12. Ahne W. Uptake and multiplication of spring viraemia of carp (*Cyprinus carpio* L.) // J. Fish Diseases.— 1978.— 1.— P. 265—268.
13. George W. Nace, Tadakazu Suyama, Takuzo Jwata. The relationship between a lysozyme-like enzyme and frog adenocarcinoma // Vir. Dis. Poikiloth. Vert.— 1965.— 126.— P. 204—221.
14. Roberts R. J., Schlotfeldt H.-J. Grundlagen der Fischpathologie.— Berlin, Hamburg: Parey.— 1985.— 425 p.
15. Temnikhanov Yr. D., Balakhnin I. A., Kompanets E. V. et al. Virus of Lower Vertebrates / Eds. W. Ahne, E. Kurstak.— Berlin etc: Springer-verlag, 1989.— P. 458—462.

Ин-т зоологии им. И. И. Шмальгаузена
АН УССР, Киев

Материал поступил
в редакцию 09.02.90