

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ЕКОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет природоохоронний
Кафедра водних біоресурсів та
аквакультури

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА МАГІСТРА

на тему: «МОРФОФІЗІОЛОГІЧНИЙ СТАТУС ЯК ВІДОБРАЖЕННЯ
АДАПТИВНИХ МОЖЛИВОСТЕЙ ОРГАНІЗМУ РИБ»

Виконала: студентка 2 курсу, групи МВБ – 23з/ф
Спеціальності 207 «Водні біоресурси та
аквакультура»

Кириченко Олена Олександрівна

Керівник ст.викладач

Матвієнко Тетяна Іванівна

Рецензент Гайдашенко Ірина Миколаївна

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ЕКОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет Природоохоронний

Кафедра водних біоресурсів та аквакультури

Рівень вищої освіти: магістр

Спеціальність 207 «Водні біоресурси та аквакультура»

(шифр і назва)

Освітньо-професійна програма «Охорона, відтворення та раціональне використання гідробіоресурсів»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри Бургаз М.І

к.б.н., доц.

“23” жовтня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ МАГІСТРА

Кириченко Олени Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи: Морфологічний статус як відображення адаптивних можливостей організму риб

керівник роботи Матвієнко Тетяна Іванівна, ст.викладач

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» жовтня 2023 року № 215 «С»

2. Строк подання студентом роботи 08 грудня 2023 р.

3. Вихідні дані до роботи: джерела наукової інформації, щодо дослідження морфологічного статусу як відображення адаптивних можливостей організму риб.

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):

Детальний аналіз наявної в літературі інформації щодо морфологічного статусу як відображення адаптивних можливостей організму риб, тощо. Визначення ступеню вивченості питання.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень) Обов'язковими рисунками є ті що ілюструють місце досліджень, графіки та таблиці, які характеризують ті чи інші показники, що використовуються для розрахунків та прогнозів необхідних для вирішення поставлених задач.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	Бургаз М.І., канд.біол.наук, доцент		
2	Бургаз М.І., канд.біол.наук, доцент		
3	Бургаз М.І., канд.біол.наук, доцент		
4	Бургаз М.І., канд.біол.наук, доцент		
5	Бургаз М.І., канд.біол.наук, доцент		

7. Дата видачі завдання _____ 23.10.2023 р. _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів магістерської роботи	Термін виконання етапів проекту (роботи)	Оцінка виконання етапу	
			у %	за 4-х бальною шкалою
1	Аналіз наукової літератури з досліджуваної теми. Написання першого та другого розділів магістерської роботи	23.10.23 – 02.11.23	90	Відмінно
2	Аналіз гематологічних показників риб при стресі. Написання третього та четвертого розділів магістерської роботи.	03.11.23 – 12.11.23	90	Відмінно
3	Рубіжна атестація	13.11.23-17.11.23	90	Відмінно
4	Адаптивна імунна система риб. Написання п'ятого розділу магістерської роботи.	18.11.23 – 25.11.23	90	Відмінно
5	Написання висновків магістерської роботи. Оформлення магістерської роботи.	26.11.23 – 30.11.23	90	Відмінно
6	Перевірка роботи науковим керівником, надання відгуку	01.12.23 – 02.12.23	90	Відмінно
7	Перевірка роботи зав. кафедрою	03.12.2023		
8	Отримання рецензії	04.12.2023		
9	Перевірка роботи на плагіат	05.12.2023		
10	Підготовка презентації	06.12.2023		
11	Попередній захист роботи на кафедрі	07.12.2023		
12	Надання роботи до деканату	08.12.2023		
	Інтегральна оцінка виконання етапів календарного плану (як середня по етапам)		90	Відмінно

Студентка _____ Кириченко О.О.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____ Матвієнко Т.І.
(підпис) (прізвище та ініціали)

АНОТАЦІЯ

МОРФОФІЗІОЛОГІЧНИЙ СТАТУС ЯК ВІДОБРАЖЕННЯ АДАПТИВНИХ МОЖЛИВОСТЕЙ ОРГАНІЗМУ РИБ

**Кириченко О.О., магістр кафедри Водних біоресурсів та
аквакультури**

Багато рибних популяцій піддаються впливу шкідливих рівнів хімічного забруднення, і тиск відбору, пов'язаний із цим впливом, призвів до еволюції толерантності. Адаптація – це сукупність морфофізіологічних, поведінкових, популяційних та інших особливостей виду, яка забезпечує можливість специфічного способу життя в певних умовах зовнішнього середовища. Адаптивна реакція проявляється в різноманітті підпорядкованих таксономічних груп у межах будь-якого великого таксона. Адаптація риб до умов існування, перш за все, полягає у зміні екстер'єрних ознак риб відповідно до певного типу екосистеми. Надмірна чисельність риб у водоймі та зміна морфології водойм призводять до певних змін у екстер'єрних та морфофізіологічних показниках риб.

Морфофізіологічний статус, як сукупність морфологічних та гематологічних показників, що об'єктивно відображають фізіологічний стан риб, може ефективно використовуватися для вирішення теоретичних та практичних питань рибогосподарської науки.

Проблеми аквакультури вимагають подальшого розвитку теорії та практики застосування морфофізіологічних індикаторів, показників червоної та білої крові.

Структура і обсяг роботи. Магістерська робота викладена на 78 сторінках, містить 7 рисунків, 12 таблиць, 43 літературних джерела.

Ключові слова: адаптація, чисельність риб, популяція, показники крові, адаптивна реакція, таксономічна група, екосистема.

SUMMARY

MORPHOPHYSIOLOGICAL STATUS AS A REFLECTION OF THE ADAPTIVE CAPABILITIES OF FISH ORGANISM

**Kirichenko O.O., Master of the Water bioresources and aquaculture
department**

Many fish populations are exposed to harmful levels of chemical pollution, and the selection pressure associated with this exposure has led to the evolution of tolerance. Adaptation is a set of morphophysiological, behavioral, population, and other features of a species that enables a specific way of life under certain environmental conditions. The adaptive response is manifested in the diversity of subordinate taxonomic groups within any large taxon. The adaptation of fish to their habitat is primarily a change in the external characteristics of fish in accordance with a certain type of ecosystem. Excessive number of fish in a reservoir and changes in the morphology of reservoirs lead to certain changes in the external and morphophysiological indicators of fish.

Morphophysiological status, as a set of morphological and hematological parameters that objectively reflect the physiological state of fish, can be effectively used to solve theoretical and practical issues of fisheries science.

The problems of aquaculture require further development of the theory and practice of using morphophysiological indicators, red and white blood counts.

Structure and scope of the work. The master's thesis is presented on 78 pages, contains 7 figures, 12 tables, 43 references.

Key words: adaptation, number of fish, population, blood parameters, adaptive response, toxin group, ecosystem.

ЗМІСТ

	ВСТУП.....	6
I	ЕЛЕМЕНТИ КРОВІ РИБ, ЇХ МОРФОЛОГІЯ ТА КЛАСИФІКАЦІЯ.....	8
	1.1 Клітинні елементи крові риб.....	9
	1.2 Форменні елементи крові риб.....	12
	1.3 Морфологія формених елементів крові риб.....	18
II	ВИКОРИСТАННЯ ПОКАЗНИКІВ КРОВІ ДЛЯ ОЦІНКИ ФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАНУ РИБИ В АКВАКУЛЬТУРІ.....	25
III	ГЕМАТОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ РИБ ПРИ СТРЕСІ.....	31
	3.1 Картина крові риб при захворюваннях.....	34
IV	ДИНАМІКА РІВНЯ ФІБРИНОГЕНА В КРОВІ РИБ ПІД ВПЛИВОМ СТРЕСА.....	43
	4.1 Вивчення динаміки рівня фібриногену у крові коропів при гіпоксії.....	46
V	АДАПТИВНА ІМУННА СИСТЕМА У РИБ.....	49
	5.1 Адаптивний імунітет у риб.....	51
	5.2 Клітинно-опосередковані реакції в адаптивному імунітеті риб.....	53
	5.3 Основний комплекс гістосумісності та активація наївних Т-клітин.....	55
	5.4 Гуморально-опосередковані реакції в адаптивному імунітеті риб.....	64
	ВИСНОВКИ.....	70
	ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРНИХ ПОСИЛАНЬ.....	73

ВСТУП

Багато рибних популяцій піддаються впливу шкідливих рівнів хімічного забруднення, і тиск відбору, пов'язаний із цим впливом, призвів до еволюції толерантності. Наше розуміння фізіологічної основи цих адаптацій обмежене, але вони, ймовірно, включають процеси, пов'язані з поглинанням, розподілом, метаболізмом та/або виведенням цільової хімічної речовини. Інші потенційні механізми адаптації включають посилення антиоксидантних реакцій, підвищену здатність до відновлення ДНК і/або тканин і зміни життєвого циклу риби, які дозволяють раннє розмноження.

Відомо, що адаптація – це сукупність морфологічних, поведінкових, популяційних та інших особливостей виду, яка забезпечує можливість специфічного способу життя в певних умовах зовнішнього середовища. Адаптивна реакція проявляється в різноманітті підпорядкованих таксономічних груп у межах будь-якого великого таксона. Адаптивну реакцію розглядають як одну із закономірностей філогенезу. Вище наведене у повній мірі стосується і представників надкласу Pisces (Риби).

Адаптація риб до умов існування, перш за все, полягає у зміні екстер'єрних ознак риб відповідно до певного типу екосистеми. Різниця між популяціями виявляється у фенотипічних особливостях окремих особин. Перш за все на риб впливають біотичні (тип живлення, конкуренція та ін.) та гідрохімічні чинники. Надмірна чисельність риб у водоймі та зміна морфології водойм призводять до певних змін у екстер'єрних та морфологічних показниках риб.

Морфологічний статус, як сукупність морфологічних та гематологічних показників, що об'єктивно відображають фізіологічний стан риб,

може ефективно використовуватися для вирішення теоретичних та практичних питань рибогосподарської науки.

Проблеми аквакультури вимагають подальшого розвитку теорії та практики застосування морфологічних індикаторів, показників червоної та білої крові.

Незважаючи на фундаментальні дослідження, проведені в галузі іхтіогематології, рівень знань про метод морфологічного аналізу крові риб і ефективність його практичного використання все ще недостатні в порівнянні з застосуванням їх у клінічній медицині. Наявні відомості про склад, способи ідентифікації, морфологічні особливості та кількісну динаміку лейкоцитів і тромбоцитів у прісноводних і морських риб не дозволяють ефективно використовувати показники білої крові як морфологічного індикатора, тому вивчення морфології клітин крові у риб залишається актуальним.

Дослідження морфологічного статусу риб має найбільше значення для створення нових технологічних прийомів вирощування: для прогнозування кількості цьоголіток у виростних ставках, оперативного нормування годівлі цьоголіток і товарної риби, а також для оцінки стану здоров'я риби. Відомо, що аеромоноз і ботріоцефальоз належать до особливо небезпечних хвороб, тому розробці способів їх профілактики приділяють особливу увагу.

Мета роботи - на основі даних про вивчення морфологічного статусу дати обґрунтування адаптаційних можливостей організму риб у різні періоди їх життя: шляхів вирішення питань вирощування риб, профілактики патологій.

І ЕЛЕМЕНТИ КРОВІ РИБ, ЇХ МОРФОЛОГІЯ ТА КЛАСИФІКАЦІЯ

Успіхи сучасного рибництва пов'язані з розвитком трьох основних напрямків прісноводної аквакультури: ставкового, індустріального та пасовищного. Перспективи їх розвитку ґрунтуються на використанні різних прийомів та методів інтенсифікації, розробці нових технологій, пошуку перспективних конкурентоспроможних об'єктів риборозведення, тобто таких шляхів, які дозволяють з найменшими витратами забезпечити максимальну рибопродуктивність.

Вирощування риби в умовах аквакультури пов'язане з постійним впливом на неї ряду факторів, у тому числі й антропогенного преса, які призводять до зниження резистентності організму та підвищення його сприйнятливості до різноманітних стресорів, включаючи і збудників хвороб.

Найважливішим механізмом, що забезпечує нормальне функціонування живих систем у змінних умовах зовнішнього середовища, є гомеостаз, який на організмовому рівні проявляється у вигляді адаптивних реакцій. Поліфункціональність крові як тканини внутрішнього середовища визначає її важливу роль у таких реакціях. Як найбільш лабільні та чутливі, її показники широко використовуються в медицині та ветеринарії для оцінки стану здоров'я та діагностики патологічних процесів.[1-3]

У промисловому рибництві гематологічний аналіз застосовували для характеристики молоді, що вирощується на заводах, для оцінки патогенного впливу паразитів і токсикантів на організм риб. Однак, дослідження в цьому напрямку стримувалися через відсутність єдиного підходу до ідентифікації

клітинних елементів крові та слабкої вивченості їхньої морфології у більшості видів культивованих риб. [2]

В останні роки морфологічні матеріали поповнилися дослідженнями функціональних властивостей клітин крові та їхньої ролі у формуванні імунної відповіді.

1.1 Клітинні елементи крові

Кров (*sanguis, haima*) є рідкою тканиною, що циркулює по кровоносних судинах, що складається з двох основних компонентів: плазми і зважених у ній формених елементів - еритроцитів, лейкоцитів і тромбоцитів (кров'яних пластинок) (табл. 1.1).

Таблиця 1.1 - Гематологічні показники риб (фізіологічна норма)

Показник Вік	Короп			
	Цьогорічки (ставки)	Цьогорічки (ставки)	Цьогорічки (садки)	Цьогорічки (басейн)
1	2	3	4	5
Гемоглобін, г / л	85,1 ± 2,3	78,1 ± 4,5	89,0 ± 2,4	75,4 ± 4,3
Гематокрит, л/лх10 ⁻²	39,9 ± 1,1	36,2 ± 0,2	35,4 ± 0,3	34,1 ± 1,0
Еритроцити, млн/мкл	1,5 ± 0,004	1,35 ± 0,4	1 ^ 09 ± 0,4	1,3 ± 0,2
Ср. обсяг еритроцитів, мкм ³	268,7 ± 10,6	342,5 ± 2,8	24,7 ± 2,7	349,6 ± 7,3
Вміст гемоглобіну в еритроцитах. Мг	56,7 ± 2,7	46,3 ± 1,9	81,6 ± 2,3	58,0 ± 4,0
Лейкоцити, тис./мкл	24,5 ± 4,3	37,5 ± 5,2	41,0 ± 4,5	39,4 ± 4,3
Тромбоцити, тис./мкл	НД	28,02 ± 3,0	НД	НД
Бласти, %	0,6 ± 0,4	0	0,3 ± 0,1	1,1 ± 0,2
проміелоцити, %	0,1 ± 0,1	0	0,1 ± 0,01	0,6 ± 0,2
міелоцити нейтрофільні, %	0,5 ± 0,2	3,2 ± 1,1	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1
паличкоядерні нейтрофіли, %	0,4 ± 0,2	5,2 ± 1,4	1,0 ± 0,3	0,8 ± 0,2
сегментоядерні нейтрофіли, %	0,3 ± 0,1	4,0 ± 0,7	1,0 ± 0,5	1,0 ± 0,3
загальна кількість нейтрофілів, %	1,6 ± 0,2	15,5 ± 1,6	3,2 ± 1,0	2,8 ± 0,7

Продовження табл. 1

1	2	3	4	5
еозинофіли і псевдоеозинофіли %	3,7 ± 1,2	4,0 ± 0,09	0	0
базофіли і псевдобазофіли,%	3,6 ± 0,8	3,5 ± 1,4	0	1,0 ± 0,5
пінисті клітини,%	0,7 ± 0,3	4,0 ± 0,7	1,9 ± 0,4	1,6 ± 0,4
моноцити,%	4,2 ± 0,5	8,8 ± 1,5	3,0 ± 0,5	2,7 ± 0,7
лімфоцити,%	85,6 ± 1,6	64,2 ± 4,9	91,5 ± 0,9	90,2 ± 1,4
вміст заг. білка в сироватці крові, г%	2,5-3,0	2,5-3,0	НД	НД

* Немає даних

** Клітинні форми у даного виду риб існують (можуть бути за певних обставин)

*** Клітинних форм у даного виду в нормі не виявлено

Основними функціями крові є дихальна (перенесення кисню в усі органи та вуглекислоти з органів); трофічна (доставка органам поживних речовин); захисна (забезпечення гуморального та клітинного імунітету, згортання крові при травмах); видільна (видалення та транспортування в нирки продуктів обміну речовин); гомеостатична (підтримка сталості внутрішнього середовища організму). [1-3]

Через кров (і лімфу) транспортуються гормони, а також інші біологічно активні речовини. Усе це визначає значної ролі крові у організмі. Втрата понад 30% крові призводить до смерті.

Риби мають замкнуту кровоносну систему. Загальна кількість крові в організмі риб варіюється в залежності від видової приналежності, віку, умов життя і фізіологічного стану (табл. 1.2). Наприклад, у костистих риб кількість крові становить середньому 2-3 % маси їх тіла. У малорухливих видів риб крові трохи більше 2 %, в активних – до 5 %. [1-3]

Кров риб має яскраво-червоний колір, маслянисту на дотик консистенцію, солонуватий смак, специфічний запах риб'ячого жиру.

У середньому для риб густина крові становить 1,035 г/см³ (1,032-1,051).

Таблиця 1.2 - Розподіл крові (На прикладі райдужної форелі)

Тканина	Частка тканини в масі тіла, %	Частка крові в тканинах, % від усієї крові	Вміст крові в тканинах, % від маси тіла
Білі м'язи	66,0	15,8	0,72
Червоні м'язи	1,0	6,0	18,00
Серце	0,2	2,0	30,00
Зябра	3,9	7,6	57,00
Травний тракт	5,1	2,4	1,41
Печінка	1,4	4,0	14,20
Судини і нирки	3,0	60,0	60,00
Решта	19,1	0,9	-

Кров згортається за 20-840 сек. гематологічних показників, можливо, визначити фізіологічний стан риби, а при аквакультури, що інтенсивно розвивається, оцінка здоров'я вирощуваних об'єктів має важливе значення (табл. 1.3).

Таблиця 1.3 - Час згортання крові у різних видів риб, сек.

Вид риб	Час згортання крові, сек.	Умови
Короп, лящ	600-840	Виловлені із природних водойм
Плотва, яз	300-380	Теж
Окунь, судак	120-180	Теж
Райдужна форель	150-250	Виловлена із штучних басейнів

Залежність часу згортання крові риб від стану нервової системи є додатковим захисним фактором, оскільки великі крововтрати можливі швидше за все у стресових ситуаціях (напад хижака, бійки). [1-3]



Рисунок 1.1 - Взяття крові у молоді осетра з хвостової вени

Кров можна відбирати з серця, зябрової вени, хвостової вени або каудального каналу (рис.1.1). Способи взяття крові залежать від розміру риб та необхідного для аналізів кількості крові. [1-3]

1.2 Форменні елементи крові.

До формених елементів крові належать три групи клітин: еритроцити, лейкоцити та тромбоцити.

Еритроцити риб мають ядро. Форма їх та величина у різних видів риб різна. У більшості риб еритроцити мають форму еліпсоїду. Завдяки присутності ядра еритроцит потовщений у середній частині. В еритроцитах риб розчинений гемоглобін, завдяки якому вони мають червоне забарвлення, тому еритроцити називають червоними кров'яними тільцями або червоною кров'ю. За обсягом еритроцити займають 41-43% по відношенню до плазми крові, тоді як лейкоцити - 2-5% від усього обсягу формених елементів. [4-6]

Головна функція еритроцитів – дихальна, це перенесення кисню та вугільної кислоти. З іншого боку, вони переносять амінокислоти. У різних риб кількість еритроцитів коливається у межах (табл. 1.4). У прісноводних - від 0,7 до 35 млн/мм³ , а у морських - від 0,09 до 4 млн/ мм³ .

Зв'язок між кількістю еритроцитів у крові риб і солоністю води як довкілля відсутній. Але є певний зв'язок між кількістю еритроцитів у крові та активністю риби. Більш активні риби мають більше еритроцитів, ніж малоактивні.

Кількість еритроцитів залежить також від систематичного становища, віку, статі та статевої активності, харчування, сезону року та факторів довкілля (PO₂, PCO₂, температури, солоності, течії і т.д.), тобто. від екологічних чинників

Видові відмінності. Так, кількість еритроцитів в організмі осетрових риб різна. Їх у порядку зменшення можна розташувати наступним чином: севрюга (1,212 млн кл /мл) > шип (1,116 млн кл /мл) > стерлядь (0,985 млн кл /мл) > осетр (0,622 млн кл /мл).

Статеві відмінності. За даними Ланге кількість еритроцитів у самців щуки дорівнює 1,99 млн кл /мл, у самок - 1,32 млн кл /мл. Як видно, у самок кількість еритроцитів менша, ніж у самців. Це підвищеним обміном речовин у організмі самців проти самками. [5,6]

У період статевої активності та нересту кількість еритроцитів зменшується, а після нересту знову збільшується.

Таблиця 1.4 - Вміст еритроцитів у крові деяких видів риб

Назва риби	Маса риби,г	Маса крові, %	Гематокрит, %	К-сть еритроцитів, млн/мм ³
Хрящові				
Катран	3000-5000	5,2-4,4	12,9-21,4	0,160-0,220
Скат-хвостокол		0,91	17,0-40,0	0,240-0,320
Кісткові				
Осетроподібні				
Білуга	27	3,4-5,0	22-28	0,6-0,9
Осетер російський	3050	4,0-5,0	19-28	0,4-0,7
Веслоніс	1000			0,2-0,5
Костисті				
Карась сріблястий	17,5-500	2,4-3,5		0,89-1,02
Короп		2,5-4,4	20-40	1,44-1,80
Амур білий	326	2,66-4,8	32-34	1,8-2,04
Товстолобик білий	146	2,4-5,6	42	2,1-2,22
Товстолобик строкатий			28-37	1,14-2,09
Буфало великоротий			36	1,19
Сом каналний			32,1	1,12 – 1,34
Форель райдужна	200		36-46	1,92

Сезон року та час доби. Найменша кількість еритроцитів відзначається у зимовий час, найбільша – восени. Число еритроцитів у риб найменше вранці, найбільше - вдень. [7]

Живлення та голодування. При тривалому голодуванні кількість еритроцитів зменшується. При тривалому годуванні – збільшується.

Фізико-хімічні фактори середовища. При нестачі O₂ протягом короткого періоду часу відбувається збільшення еритроцитів за рахунок їх звільнення з депо крові. Збільшення числа еритроцитів при ядусі або асфіксії призводить до кращого постачання кисню організму та звільнення CO₂ з нього. При тривалому вмісті риб в умовах зниженого парціального тиску кисню (PO₂) настає анемічний стан (анемія) та зменшення кількості еритроцитів, а при підвищенні тиску PO₂

навпаки збільшення кількості еритроцитів. При накопиченні у воді CO_2 відбувається збільшення кількості еритроцитів. Кількість еритроцитів зростає під впливом Cu , NH_3 та інших токсикантів .

Спостерігаються зміни у складі крові під час перекладу риб із природного середовища на штучну. Так, у перші 10 днів відбувається зниження кількості еритроцитів у коропів при перенесенні їх із ставка (1,75 млн кл /мл) в акваріум (1,646 млн кл /мл) і надалі їх кількість знижується до 1,26 млн кл /мл. Це пов'язано зі зменшенням енергетичного обміну риб (при переході риб з річки в ставок, з ставка в акваріум тощо). Зниження рН викликає збільшення кількості еритроцитів у крові риб. Це з порушенням газового рівноваги. [7-9]

Таким чином, кількість еритроцитів у крові риб залежить від фізіологічного стану риби і від факторів зовнішнього середовища.

Систематичне становище. Кількість еритроцитів збільшується в ряду круглороті < селяхії > костисті. Це з збільшенням рівня обміну речовин, посиленням інтенсивності окислювально -відновних процесів.

Слід зазначити, що у крові деяких видів риб еритроцити відсутні. Наприклад, їх немає в крові личинок вугра та деяких оселедцевих риб, а також у деяких антарктичних риб еритроцитів дуже незначна кількість або вони взагалі відсутні.

Лейкоцити – це білі кров'яні тільця. Основне їхнє фізіологічне призначення - захисна, або, як її називають, фагоцитарна функція. Якщо в тканину або кров потрапляє стороннє тіло (живе або мертво), лейкоцити оточують його і знешкоджують.

Число лейкоцитів у крові риб значно менше, ніж еритроцитів, але значно більше, ніж у ссавців. Кількість лейкоцитів у 12-100 разів менша, ніж еритроцитів. [7-9]

Кількість лейкоцитів у крові риб залежить від багатьох факторів як зовнішнього, так і внутрішнього характеру (вікові зміни, стать та статева

активність, вгодованість, сезонність, температура, інфекційні та паразитарні захворювання) (табл.1.5).

Таблиця 1.5 - Вміст лейкоцитів у крові риб

Назва риби	Вміст лейкоцитів, тис./мм ³
Осетр російський	26,0-28,0
Карась сріблястий	51,0
Сазан	16,0-43,0
Амур білий	76,4-99,2
Товстолобик білий	87,2-98,0
Товстолобик строкатий	34,2-62,0
Буфало великоротий	25,9
Форель райдужна	25,5-34,0
Лосось	32,0

Лейкоцити розрізняються за величиною, формою та будовою ядер, за кількістю цитоплазми та наявністю зернистості в ній, за здатністю забарвлюватися кислими та основними барвниками. [10]

Відповідно до класифікації Іванової, заснованої на фарбованості ядер та цитоплазми виділяють:

- 1) агранулоцити (лімфоцити та моноцити)
- 2) гранулоцити (нейтрофіли, псевдобазофіли , псевдоеозинофіли).

Кількісне співвідношення цих груп клітин виражається лейкоцитарною формулою. Лейкоцитарна формула у риб украй нестійка і змінюється в залежності від ряду факторів. Так, кількість моноцитів збільшується під час нересту (лящ, судак); кількість нейтроцитів зростає при зміні температури (короп, сом) або значно знижується при посиленні харчування (лящ, форель). При цьому кількість моноцитів та поліморфноядерних клітин збільшується.

У білій крові риб переважають лімфоцити, які становлять 43-95% від усіх лейкоцитів. Лімфоцити - це дрібні клітини з великими темно-фіолетовими

кольорами ядрами. Найбільші клітини - це моноцити. Вони характеризуються великими овальними ядрами. У цитоплазмі знаходяться вакуолі та азурофільна зернистість. Серед зернистих клітин найчастіше зустрічаються нейтрофіли, що характеризуються майже безбарвними зернами у цитоплазмі. У деяких видів (сом, карась, рибець, шемая) нейтрофіли мають розсічені багатолопатеві ядра. У сазана, ляща та линя нейтрофіли мають нерозчленовані округлі ядра. Еозинофіли – це клітини із щільним круглим або овальним ядром; у цитоплазмі присутні щільнолежачі гранули слаборожевого кольору. Псевдоеозинофіли мають у цитоплазмі дрібні голчасті та округлі гранули малинового кольору. У базофілів гранули великі червоно-фіолетового кольору. Псевдобазофіли характеризуються червоно-фіолетовим , майже чорною зернистістю. [11]

У крові судака, йоржа, бичків, камбали містяться лише незернисті форми лейкоцитів.

Тромбоцити – це клітини, основною фізіологічною функцією яких є зсідання крові. У риб форма цих клітин може бути округлою та веретеноподібною. Якби кров не мала властивості згортатися (утворювати згустки - тромби), то навіть при слабкому, незначному пораненні вся кров витекла б назовні. А водне середовище полегшує витікання крові. Значні втрати крові як шкідливі організму, а й нерідко викликають летальний кінець. Кров завжди повинна бути рідкою в кров'яному руслі, швидко перетворюватися на потік при розриві стінки судини і закривати рану. У крові є дуже складна система згортання. У риб кров згортається майже моментально, тобто в межах 10-12 секунд(табл. 1.6).

Швидкому зсіданню крові риб сприяє слиз шкіри, в якій міститься значна кількість ферменту тромбокінази. Швидка згортання крові має захисне значення для життя риб. У риб знайдені основні тромбогенні білкові компоненти: тромботропін, протромбокіназа, тромбокіназа, протромбін, тромбін та фібриноген, характерні для теплокровних тварин. [11-13]

Таблиця 1.6 - Вміст тромбоцитів у крові риб

Назва риб	Вміст тромбоцитів, тис./мм ³
Балтійський лосось	11,4-15,4
Короп	10-39
Білий товстолобик	24-83
Строкатий товстолобик	9-56
Великоротий <u>буфало</u>	5-25

У схематичному вигляді схему згортання крові можна у наступному вигляді. У момент, що передує згортанню крові (дотик крові з чужорідною поверхнею), включається "система факторів згортання". В результаті виходить активна тромбоквіназа, яка разом із розчиненим у крові кальцієм діє на білок протромбін, утворюючи при цьому тромбін. Фермент тромбін діє на білок фібриноген, який згортається в потік, перетворюючись на фібрин. [11-13]

Крім системи згортання, в крові міститься система ферментів, що перешкоджають згортанню крові. До них відносяться гепарин та гепариноподібні речовини, які синтезуються печінкою, а також фібринолізин та його активатори. Гепарин – це антикоагулянт, що перешкоджає дії тромбіну та гальмує утворення фібрину. Протизгортання та згортання системи знаходяться в певній рівновазі.

1.3 Морфологія формених елементів крові

На частку формених елементів крові припадає в середньому від 10,0 до 30,0% усієї маси крові риб та від 30,0 до 50,0% – у птахів та ссавців. Відношення обсягу формених елементів та плазми визначають за допомогою гематокриту.

Еритроцити становлять основну масу формених елементів крові. Найменша кількість еритроцитів в 1 мкл міститься у крові круглоротих і риб (близько 0,15 млн.), дещо більше (3-4 млн.) – у крові птахів, і максимально – у крові ссавців (7,5 млн. та більше).

Між кількістю еритроцитів в одиниці об'єму крові та їх обсягом є обернено пропорційна залежність: еритроцити ссавців – найменші (бл . 60-95 фл), а еритроцити хвостатих амфібій – найбільші (10000 – 1400). За формою еритроцит є двояковогнутий диск, середній діаметр якого у ссавців 7,5 мкм, а товщина -2 мкм.

Еритроцити містять до 95% сухої маси гемоглобіну і завдяки цьому здійснюють дихальну функцію крові. Спорідненість гемоглобіну до кисню регулюється 2,3-дифосфогліцератом, що знаходиться в значних кількостях в еритроцитах. [13-15]

Встановлено, що менше 3% молекул гемоглобіну розташовано на поверхні еритроцитів, і з точки зору оптимальних умов контакту з киснем решта гемоглобіну знаходиться в невідгідних умовах. Однак молекули гемоглобіну в товщі еритроцитів розташовані в певному порядку і мають вільний обертальний рух, що сприяє активному, транспорту кисню.

Використання методів поділу речовин дозволило встановити, що гемоглобін багатьох тварин (кінь, буйвол, коза, вівця) має гетерогенну природу; гемоглобін корови, свині, лами, верблюда, кролика – гомогенний. Відзначено значні відмінності та у здатності гемоглобіну повністю оксигенуватися, тобто. перетворюватися на оксигемоглобін. Так, гемоглобін оксигенується на 50% у скумбрії – 17 мм ртутного стовпа, щуки – 2,5 мм рт. ст. Ці відмінності у величині спорідненості гемоглобіну до кисню у різних тварин відображають несхожість екологічних умов, до яких треба пристосовуватися організмам у боротьбі за існування. [13-15]

Молекула гемоглобіну транспортує близько 20% об'єму вуглекислоти, що виділяється організмом, решта переноситься у вигляді фізично розчиненої (10%) і хімічно пов'язаної, переважно у вигляді бікарбонату натрію (70%) формі плазмою крові.

В еритроцитах та на їх поверхні можуть бути різні антигенні фактори (наприклад, аглютиногени), які обумовлюють різноманітні імунологічні особливості крові. [16]

У фіксованих і забарвлених звичайними гематологічними барвниками мазках крові еритроцити виглядають у вигляді круглих клітин рожевого або сірувато-рожевого кольору з просвітленням в центрі за рахунок двояковогнутої форми. Забарвлення еритроцитів кислими барвниками пов'язані з присутністю гемоглобіну, отже її інтенсивність може бути показником насиченості еритроцитів гемоглобіном.

Лейкоцити, або білі (безбарвні) клітини, у периферичній крові в нормі циркулюють у вигляді зрілих зернистих форм, а також лімфоцитів та моноцитів. Зернисті лейкоцити залежно від характеру грануляції в цитоплазмі поділяються на нейтрофільні, базофільні та еозинофільні гранулоцити.

Нейтрофіли є високоспеціалізованими клітинами із вираженою захисною функцією. Це пов'язано з фагоцитарною та руховою активністю нейтрофілів, здатністю виробляти бактерицидні (лізоцим) та анітоксичні фактори, пірогенні фактори. Ці клітини здатні виділяти біологічно активні речовини (катепсини та ін), що змінюють проникність судин, здатні переносити антитіла, посилювати проліферацію гранулоцитів кісткового мозку. Специфічна активність нейтрофілів забезпечується численними ферментними системами: у мітохондріях за участю ферментів циклу Кребса здійснюється синтез АТФ, у спеціальних гранулах локалізуються пероксидаза та цитохромоксидаза, в лізосомах – кисла та лужна фосфатаза, неспецифічні за, арисульфатаза та ін.

До складу специфічної зернистості входять лізоцим, різні амінокислоти, ліпіди, глікоген. Глікоген є найважливішою енергетичною речовиною, що забезпечує анаеробний гліколіз та життєдіяльність діяльності нейтрофілів у несприятливих умовах. [17-20]

Діаметр зрілих нейтрофілів 10-15 мкм; більшу частину клітини займає цитоплазма, що містить специфічну зернистість. Ядро сегментоядерних нейтрофілів представлено 2-4 сегментами, з'єднаними тонкими нитками хроматину; у паличкоядерних - С-або S-подібної форми.

У гематологічних препаратах цитоплазма нейтрофілів рожево-сірого кольору містить дрібну блідо-фіолетову зернистість, рівномірно розподілену по всій цитоплазмі. Ядро – темно-фіолетового кольору; у сегментоядерних іноді при фарбуванні не виявляються міжсегментні перемички і складається враження, що у клітці кілька дрібних ядер. У деяких випадках, коли сегменти щільно прилягають один до одного, виникають труднощі в диференціюванні сегментоядерних від паличкоядерних нейтрофілів: робота з мікрогвинтом мікроскопа дозволяє ідентифікувати їх. [17-20]

Базофіли беруть участь в алергічних реакціях, процесах гемокоагуляції та багато функціональних та метаболічних особливостей базофілів неясні, оскільки дослідження цих нечисленних гранулоцитів вкрай обмежені. Відомо, що базофіли здатні виробляти гістамін, в їх гранулах виявлені скупчення гепарину, а також містяться ліпопротеїди, пероксидаза, гіалуронова кислота, амінокислоти, кисла фосфатаза, арилсульфатаза, дегідрогенази.

За розміром базофіли трохи менше (8-10 мкм) нейтрофілів. У пофарбованих препаратах цитоплазма, блідо-рожевого кольору містить темно-фіолетові гранули різної величини. Гранули добре виявляються при фарбуванні мазків за Паппенгеймом; при використанні інших барвників вони легко розчиняються у воді та виглядають блідо-фіолетовими, розмитими структурами. Ядро клітини велике, пофарбоване в темний колір, не має певної форми, іноді нагадує лист рослини. [17-20]

Еозинофіли беруть участь в алергічних реакціях, мають фагоцитарну і рухову активність, але меншою мірою, ніж нейтрофіли. Еозинофіли здатні сорбувати на своїй поверхні антитіла, різні токсичні речовини, навіть

інактивувати їх, завдяки чому беруть участь в імунологічних та антитоксичних властивостях крові.

В еозинофілах виявлено високий вміст пероксидази, арисульфатази, катепсинів, цитохромоксидази, сукциндегідрогенази, амінокислот, фосфоліпідів та інших речовин, головним чином зосереджених у специфічних гранулах. Участь еозинофілів в алергічних реакціях пояснюється вмістом у них гістамінозвільнюючих та інгібуючих звільнення гістаміну з опасистих клітин особливих субстанцій. [17-20]

Маючи розміром 12-15 мкм, еозинофіли мають досить характерну структуру. У пофарбованих препаратах вони відрізняються великою, великою рожевою зернистістю, що заповнює всю цитоплазму клітини. В окремих клітинах виявляються гранули світло-фіолетового кольору. Ядро частіше розташоване ексцентрично і має дві-три частки. Порівняно з сегментним ядром нейтрофілів, ядро еозинофілів пофарбоване менш інтенсивно та більших розмірів.

Лімфоцити є центральною ланкою імунної системи організму. Вони відповідають за формування специфічного імунітету і виконують функцію імунного нагляду в організмі, забезпечують захист від усього чужорідного і зберігаючи генетичну сталість внутрішнього середовища. Це завдання лімфоцити виконують завдяки наявності на оболонці спеціальних ділянок - рецепторів, що активуються при контакті з чужорідним антигеном. [17-20]

Лімфоцити синтезують захисні антитіла, лізують чужорідні клітини, забезпечують знищення власних мутантних клітин, здійснюють імунну пам'ять, беруть участь у реакції відторгнення трансплантату.

Виконання цих функцій здійснюється спеціалізованими формами лімфоцитів. В даний час розрізняють три групи лімфоцитів: Т-лімфоцити (тимусзалежні), В-лімфоцити (бурсазалежні) і нульові.

Т-лімфоцити утворюються в кістковому мозку з клітин-попередників, проходять стадію диференціювання у вилочковій залозі (тимус), а потім

потрапляють у кров, лімфатичні вузли, селезінку. Серед Т-лімфоцитів є спеціалізація. Розрізняють клітини-хелпери (помічники), що сприяють перетворенню В-лімфоцитів на плазматичні клітини; клітини- супресори (гнобителі), що контролюють співвідношення різних форм лімфоцитів та блокують надмірні реакції В-лімфоцитів; клітини-кілери (вбивці), безпосередніх платівок, тривалість життя яких 8-12 діб. [19-21]

Тромбоцити виконують низку найважливіших функцій. Один із них участь у процесі гемостазу. У тромбоцитах крім численних ферментів та біологічно активних сполук, присутні речовини, які називають тромбоцитарними факторами, що беруть участь у згортанні крові. В даний час відомо більше 11 факторів, що регулюють процеси адгезії (прилипання до поверхні) тромбоцитів, їх агрегації (склеювання), зв'язування гепарину, ущільнення кров'яного згустку, звуження судин та ін. (рис. 1.2).

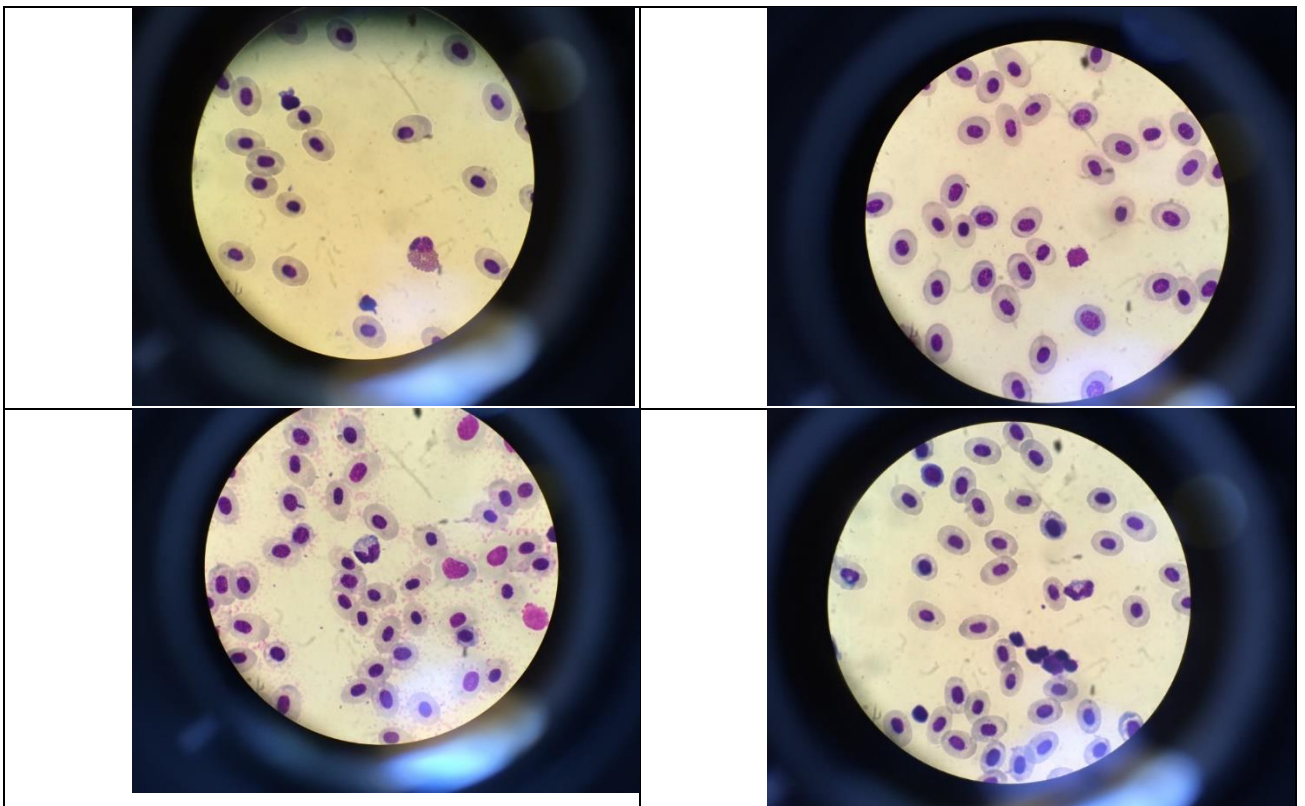


Рисунок 1.2 - Тромбоцити риб.

Крім участі у гемостазі, тромбоцити виконують функцію транспорту креаторних речовин, важливих збереження структури судинної стінки. Вони поглинаються клітинами ендотелію, доставляючи їм макромолекули, що знаходяться в тромбоцитах. З цією метою щодня витрачається до 15% циркулюючих у крові тромбоцитів. При порушенні зазначеного процесу ендотелій судин піддається дистрофії і починає пропускати через себе еритроцити. Крім цього, тромбоцити здатні фіксувати антитіла та виконують фагоцитарну функцію. Доведено й імуногенні властивості тромбоцитів. [22]

У мазках крові, пофарбованих звичайними барвниками, тромбоцити виглядають як дрібні круглі або овальні утворення. Їх структура представлена гомогенною периферичною зоною (гіаломер), забарвленою в сіруваті або блакитні кольори, і центральною – зернистою (грануломер) зоною, забарвленою у світло-фіолетовий колір.

II ВИКОРИСТАННЯ ПОКАЗНИКІВ КРОВІ ДЛЯ ОЦІНКИ ФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАНУ РИБИ В АКВАКУЛЬТУРІ

Прісноводна аквакультура та її основні напрями - пасовищний, ставковий та індустріальний - включають ряд біотехнічних прийомів та методів, спрямованих на підвищення рибопродуктивності. В основу вирощування риби має бути покладено принцип найповнішого задоволення її фізіологічної потреби. Кількісні показники взаємовідносин між фізіологічними потребами організму та лімітуючими факторами умов вирощування, що є в будь-якій біотехніці, повинні бути об'єктивними та доступними. Одним із них є картина крові, різні характеристики якої можуть задовольняти цим вимогам. [23-25]

У ставковому рибництві підвищення щільності посадки риби є найпоширенішим способом підвищення рибопродуктивності. Для оцінки впливу цього фактора на показники білої крові нами простежені зміни в лейкоцититарній формулі у цьогорічок, вирощених при невисокій щільності посадки - 10 тис.шт./га, розрахованої на споживання природних кормів, та ущільненої - 100 тис. шт./га. Лейкоцитарна формула цьогорічок коропа, вирощених при розрідженій посадці, характеризувалася наявністю невеликої кількості бластних форм. Майже всі групи лейкоцитів виявлено в липні та серпні, що говорить про активний лейкопоез. З осені з гранулоцитів постійно зустрічалися лише нейтрофіли, причому більший відсоток з них припадав на метамієлоцити та паличкоядерні форми. Інші категорії гранулоцитів зі зниженням температури ставали більш рідкісними. Постійнішим було число агранулоцитів. У цьому лімфоцити становили 70-80% всіх лейкоцитів, а частка моноцитів протягом сезону поступово зростала. Щільність посадки, суттєво відбившись на темпі вагового приросту риби (кінцева навішування 30 і 10 г відповідно), не могла не позначитися на його кровотворній функції. Насамперед, у крові цьоголіток із

ставка з щільною посадкою не виявлено бластні форми, але протягом сезону відзначали псевдо-базофіли і нейтрофіли (3,5 і 15,5 % відповідно), тобто гранулопоез активніший. Очевидно, що при уповільненому зростанні риб резистентність їхня нижча, що позначиться в умовах напруженої зимівлі.

Оскільки збільшення щільності посадки завжди пов'язане з використанням комбікормів, спостереження за впливом щільності посадки на лейкоцитарну формулу двохрічок коропа проводили протягом літа в трьох ставках, що відрізняються за щільністю посадки та годівлі. Лейкоцитарна формула двохрічок коропа, вирощених в умовах, наближених до природних, містить усі категорії гранулоцитів, з них нейтрофіли становлять більший відсоток, а еозинофілів дуже мало. Відсоток моноцитів у лейкоцитарній формулі до кінця сезону збільшується. [23-25]

Лейкоцитарна формула риб з ставків, де їх годували комбікормом протягом сезону, має невеликі коливання. Результати дослідів зазнали дисперсійного аналізу. Він показав, що щільність посадки не істотно впливає на лейкоцитарну формулу (до 27.0%), в той же час годівля риби комбікормом активізує лейкопоез. Протягом літа (червень, липень, серпень) його вплив на лейкоцитарний склад досить високий (27-67% на нейтрофіли, 42-47% -базофіли, 40-72% - еозинофіли та 54-81% - лімфоцити).

Підсумовуючи, можна сказати, що вплив щільності посадки при забезпеченості риби комбікормом у цьогорічок більш виражено, ніж у дворічок, і проявляється в зниженні показників червоної крові і посиленні гранулопоезу.

Величина гематологічних показників значною мірою визначається умовами вирощування риби. Оскільки одним із завдань рибництва є відпрацювання та освоєння високоінтенсивних методів, то при розробці гематологічної норми слід прийняти такий рівень інтенсифікації (щільність посадки, годівля, добрива та інших.), який забезпечує досить високий середньодобовий приріст маси. [26]

У таблиці 2.1 представлені гематологічні показники цьогорічок коропа, вирощених при різних технологіях. Для порівняння використаний матеріал від двадцятиграмових коропів, вирощених приблизно при одній і тій же температурі (у ставках - 22 ° С, садах, басейнах -24 ° -26 ° С. УЗВ -24 ° С). При цьому отримані результати відрізняються один від одного, тому що відображають технологічні особливості вирощування та рівень адаптивної реакції показників крові. [26]

Наочним прикладом такої адаптації можуть бути дослідження показників крові риб, при їх вирощуванні в установках із замкнутим водообміном (УЗВ). Дослідження показують, що підвищений темп зростання, характерний для коропа, що вирощується в УЗВ, супроводжується нижчим вмістом гемоглобіну і числа еритроцитів, ніж у риб такої ж маси, що вирощується в ставках (табл. 7).

Таблиця 2.1 - Гематологічні показники сеголеток коропа, вирощених за різних технологій

Показники	Ставки		Садки	Басейни	УЗВ
	Екстенсивна технологія	Інтенсивна технологія			
Гемоглобін, г/л	85,1±2,3	78,1±4,5	89,0±2,4	75,4±4,3	59,5±3,4
Еритроцити, млн/мкн	1,5±0,004	1,35±0,4	1,09±0,04	1,3±0,2	1,0±0,04
Гематокрит, л/л x 10 ⁻²	39,9±1,1	36,2±0,2	35,4±0,2	34,1±1,0	30,6±1,6
СТЕ, пг	56,7±2,7	46,3±1,9	81,6±2,3	58,0±4,0	59,6±1,6
ШОЕ, мкм ³	268,7±10,6	342,5±2,8	324,7±2,7	349,6±7,3	303,3±0,9
Лейкоцити, тис/мкл	24,5±4,3	37,5±5,2	41,0±4,5	39,4±4,3	52,7±0,2
Лейкоцитарна формула: % Бласти	0,6±0,4	0	0,4±0,1	1,7±0,2	2,1±0,3

Особливо значні ці відмінності (майже в 2 рази) для молоді до 20 р. Виявлена анемія, ймовірно, пояснюється запізненням у розвитку кровотворної системи, що виникає на тлі інтенсивного зростання соматичного риби. Очевидно, високий вміст кисню у воді дозволяє навіть невисокому рівню гемоглобіну забезпечувати метаболічні процеси, що активно протікають в організмі.

У міру зростання риби та формування кровотворних органів спрямованість адаптивних реакцій із частково гіпофункціональних переходить до частково гіперфункціональних. Так, при товарному вирощуванні коропа в УЗВ концентрація гемоглобіну поступово зростає від 77,9 до 105,8 г/л, досягаючи максимально високих для коропа значень -121,6 г/л. [27-29]

Аналогічні результати отримані в ході проведення досліджень щодо відпрацювання технології вирощування канального сома в УЗВ. Досягаючи за 165 діб товарної маси та виходу продукції 100-120 кг/м³ з одиниці об'єму рибоводної ємності, риба росла без різких коливань показників гемоглобіну (59,0±2,0 г/л) та загального білка (64. ±1,2). Гематокритна величина поступово зростала (з 27,5 до 55,6 л/л x10г), що пов'язано зі зміною розмірів еритроцитів (вони стають більшими), збільшується їх оснащеність гемоглобіном (до 31,6 пг). Зіставлення цих результатів з наявними в літературі даними показує, що у сомів, що вирощуються в ставках, значення всіх показників на 30-40% нижче, ніж у спостереженнях. [28]

Отримані результати показують, що вирощування риби в УЗВ супроводжується рядом адаптивних реакцій крові. У молоді спостерігається фізіологічна анемія, яка зі зростанням риби компенсується. Надалі для забезпечення більш інтенсивного перебігу обмінних процесів, що ведуть до підвищеного масонакопичення, гемопоез активізується, що призводить до поліцитемічної гіперволемії, тобто збільшення кількості крові за рахунок переважного збільшення кількості еритроцитів.

Найскладнішим питанням індустріального рибництва є проблема годівлі. При розробці штучних дієт, особливо при складанні рецептів гранульованих кормів, фізіологічний контроль за станом риб, що споживають комбікорми, є необхідним. У процесі дослідження фізіологічного стану риб, які отримують штучні корми, виділено групу показників найбільш чутливих до неповноцінності їжі. Це вміст гемоглобіну, число еритроцитів, активність еритропоезу та лейкопоезу, білок сироватки.

Дослідження двохрічок "дикої" райдужної форелі показали, що вміст гемоглобіну, число еритроцитів і гематокрит на 15-20% вище у риб з річки, ніж у форелі, що вирощується в господарстві. Активність еритропоезу у "дикої" риби дещо нижча. Тобто у риб, що живляться комбікормом, частка молодих еритроцитів 13-18%, тоді як у "дикої" вона не перевищує 9%. [17-20]

Гематологічні показники від плідників каспійського лосося у відловлених з річок, характеризуються високим вмістом гемоглобіну (близько 100 г/л), великою кількістю еритроцитів (1,05 млн/ мкл), які представлені в основному зрілими формами. У ремонтно-маточного стада лососів, що вирощується на заводі вміст гемоглобіну не перевищує 92 г/л, кількість еритроцитів 0,90 млн/ мкл, кількість молодих еритроцитів досягає іноді 38,6%.

Таким чином, годівля риби комбікормом формує в організмі ряд адаптивних реакцій, однією з яких є незначна (компенсаторна) анемія. Її не слід плутати з анемією, яка спостерігається у риб при аліментарних токсикозах.

Різноманітні адаптивні реакції крові відзначені за результатами товарного вирощування форелі в індустріальній аквакультурі.

Проведені на форелі дослідження виявили, що тип господарювання (ставкове, садкове і басейнове) не істотно впливає на величину гематологічних показників у товарної форелі, більш значний вплив температури води та її солоності.

Отже, проведені дослідження свідчать, що показники крові об'єктивно відбивають гомеостатичні адаптивні процеси в організмі. Вони мають високі корелятивні зв'язки із щільністю посадки, годівлею, температурним режимом та іншими факторами, що впливають на нормальне зростання та розвиток. Гематологічні показники риб, вирощених за різних технологій, ілюструють ряд таких адаптації. За технологічну норму, рекомендовану для оперативного контролю за фізіологічним станом риби, що вирощується, слід прийняти такий рівень гематологічних показників, який забезпечує не тільки рівновагу організму і довкілля, але і його оптимальний ваговий приріст.

III ГЕМАТОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ РИБ ПРИ СТРЕСІ

В умовах високоінтенсивного вирощування риби систематично піддаються дії екстремальних факторів: несприятливих змін кисневого та гідрохімічного режиму, різких коливань температури, травматизації при облові, транспортуванні та медикаментозних обробках, годівлі неповноцінними кормами, впливу екзомету-болітів при переуплотненні.

Загальний адаптаційний синдром у риб, незалежно від виду стресора, характеризується первинними та вторинними ефектами. До первинних відносяться підвищення в крові концентрації катехоламінів, головним чином адреналіну та кортикостероїдів, переважно кортизолу. Вторинними реакціями є зростання в крові концентрації глюкози і молочної кислоти, лейкопенія, лімфопенія, еозинопенія, нейтрофілія. [30]

У досліджах визначали зміни в картині крові сеголеток і двохліток коропа при дії наступних стрес-факторів, що найчастіше зустрічаються в риборицтві: облова, імітації перевезення і теплового шоку. Динаміку відновлення показників крові вивчали після дії обловного стрес-фактора через 1, 3, 8, 13 та 20 діб.

Характер виявлених при дії різних стресорів змін показників червоної крові неоднозначний залежить від виду стрес-фактора. Вочевидь, їх слід зарахувати до адаптивних реакцій системи крові на несприятливі умови середовища, вкладених у підтримку гомеостазу. Використання цих параметрів для діагностики стресу, мабуть, безперспективне.

Найбільш значні зміни при одноразовій дії стрес-факторів відзначені в картині білої крові - зростання лейкоцитів, числа тромбоцитів, лейкоцитопенія. При цьому зміни в лейкоцитарній формулі, в основному, відносяться до лімфоцитів, моноцитів і пінистих клітин. Лейкопенія характеризується лімфопенією та підвищенням числа пінистих клітин. [30]

У рибоводній практиці частіше має місце не одноразовий і короткочасний, а багаторазовий і тривалий вплив будь-якого стресора або кількох стрес-факторів одночасно. Тому вивчення фізіологічного стану риби у умовах має певне практичне значення. [30]

Дослідження були проведені на двохрічках коропа, які протягом 18 днів відчували хендлінг . При багаторазовому тривалому впливі стрес-фактора на коропа відзначено значне зниження величини лейкокриту , числа тромбоцитів та лейкоцитів (табл.3.1).

Таблиця 3.1 – Зміна гематологічних показників коропа та канального сома при стресі

Показники	Короп		Канальний сом	
	Контроль	Хендлінг	Контроль	Температурний стрес
Ер., млн/мкл	1,8±0,08	1,2±0,02	2,2±0,2	1,9±0,1
Г.,г/л	77,0±2,4	81,9±2,8	61,0±1,4	59,0±1,7
Гк., л/л x 10 ⁻²	47,7±1,2	43,9±0,7	47,7±1,5	55,6±2,3
Лк., %	2,1±0,1	1,0±0,2	-	-
Тр., тис/мкл	41,6±2,9	20,5±2,1	-	-
Лц., тис/мкл	76,2±3,9	56,0±3,1	44,0±1,0	40,0±0,9
МН, %	0,35±0,1	1,8±0,3	-	-
ММН, %	1,3±0,1	2,2±0,4	-	-
ПН, %	0,65±0,1	2,0±0,3	-	-
СН, %	0,4±0,1	1,8±0,3	-	-
ОЧН, %	2,7±0,2	8,0±0,9	6,4±0,3	14,3±1,7
ЛК, %	4,3±0,4	2,5±0,4	0	0,4±0,03
М, %	3,8±0,3	4,3±0,3	4,7±0,2	7,4±1,3
Л, %	89,2±0,7	85,2±1,1	85,8±3,4	65,4±2,6

Також відзначені лімфопенія та моноцитопенія. У лейкоцитарній формулі збільшено відсоток нейтрофілів.

При товарному вирощуванні канального сома в УЗВ проведення сортування та пересадки в інший силос призводить до збільшення вмісту гемоглобіну (з 54 до 74 г/л), зниження гематокритної величини (з 47,7 до 38,0 л/л x 10⁻²). та числа лейкоцитів (з 59 до 22 тис / мкл). [30-33]

Різде зниження температури вода (12° проти 24° в силосах) не змінило показників червоної крові, проте кількість лейкоцитів скоротилося вдвічі.' З табл.6 видно, що стрес від холодної води з'явився у різкому зниженні числа лейкоцитів та їх перерозподілі: зникненні бластів, збільшенні частки промієлоцитів та нейтрофілів та зниженні лімфоцитів. Реакція крові у канальних сомів має спільні риси зі стрес-реакцією коропа.

Спеціально поставлені експерименти дозволили з'ясувати, що відновлення показників червоної крові після дії стрес-фактору у двохрічок коропа відбувається протягом 3 діб. Число тромбоцитів і рівень лейкокриту відразу після стресування різко зростають, а потім протягом 1-3 доби так само різко знижуються. Їх відновлення завершується на 20-ту добу. Лейкоцити знижуються за рахунок лімфоцитів і моноцитів і досягають мінімальних значень на третю добу, а приходять до норми лише до кінця третього тижня спостережень. [31]

Отже, звичайні для індустріального рибництва біотехнічні прийоми, як облов, транспортування, і навіть різкі коливання температури води, викликають глибокі фізіологічні зміни у організмі риб. характерні для стрес-реакції. Оцінка можлива за допомогою гематологічних показників. При цьому найбільш характерною реакцією крові у риб при стресі, як і в інших хребетних тварин, є різке (у 2-3 рази) зниження числа тромбоцитів, лейкокриту та числа лейкоцитів.

Розвиток загального адаптаційного синдрому на стадії тривоги і резистентності спрямоване підвищення стійкості організму риб до дії стрес-фактора. У той же час у стадії виснаження ця реакція торкається імунокомпетентних груп клітин крові - лімфоцити, еозинофіли, нейтрофіли, що,

у поєднанні з відносно тривалим періодом їх відновлення після стресування, повинно відбиватися на резистентності риби та її сприйнятливості до збудників захворювань.

3.1 Картина крові риб при захворюваннях

Успішна боротьба із хворобами риб залежить від своєчасної та правильної постановки діагнозу. Тільки даних гематологічного аналізу зазвичай недостатньо визначення причини захворювання, проте, з допомогою можна будувати висновки про характері і глибині патологічного процесу, ступеня патогенності збудника. Відомості про зміни в картині крові при патологічних станах дають можливість поглибити уявлення про патогенез вивчених захворювань та взаємовідносини компонентів системи паразит-господар.

У розділі представлені розгорнуті матеріали динаміку змін показників крові при найпоширеніших захворюваннях. [32]

Зміна гематологічних показників коропа та канального сома під час стресу зустрічаються при вирощуванні риб в аквакультурі: міксобактеріозі молоді осетра, аеромонозі, бронхіомікозі, запаленні плавального міхура коропа, криптобіозі каспійського лосося, хилодонельозі, іхтіофтиріозі, дектилогірозефі і у коропа та деяких аліментарних токсикозах риб.

У іхтіопатологічній літературі дискутується питання про ступінь специфічності змін гематологічних показників при різних захворюваннях для використання їх у діагностичних цілях. Безумовно специфічною можна вважати морфологічну картину при ВПП (сферопорозі) коропа та криптобіозі лосося, коли в мазках крові виявляється збудник. На підставі цього можна ставити діагноз задовго до появи клінічних ознак гострої течії. Складніше питання виявлення специфічних зрушень у числі лейкоцитів, що характеризують патогенез тієї чи іншої захворювання.

Для їхнього з'ясування досліджували кров від риб з типовими клінічними ознаками при гострій формі хвороби. Дослідження показали, що при кожному з них формується комплекс відхилень у червоній, і особливо в білій крові, що відображає специфіку патологічного процесу. [32]

Міксобактеріоз молоді осетра супроводжується поліхроматофільною анемією та лейкоцитозом, за рахунок викиду в кров бластів, нейтрофілів та лімфоцитів. Аеромоноз коропа характеризується анемією та лейкопенією. Остання проявляється у зниженні всіх груп нейтрофілів, моноцитів та лімфоцитів та різким збільшенням промієлоцитів та макрофагів. При бронхіомікозі відзначаються нормохромна анемія, анізоцитоз, моно- та лімфоцитоз.

Наявність у мазках крові клітин Чаба є діагностичною ознакою ВПП коропа. Гостра форма захворювання супроводжується анемією та лейкоцитозом, викликаним збільшенням базофілів, моноцитів, лімфоцитів.

Діагностичною ознакою криптобіозу лососів є виявлення понад 25 гемофлагелят на 1000 еритроцитів. При гострій формі захворювання (понад 100 екз./1000 ер.) розвивається різко виражена анемія та лейкопенія. Остання проявляється як моно-і лімфопенія. [33]

Гематологічна картина при хілодонельозі залежить від сезону. При зимових епізоотіях вона характеризується поліхромазією, нейтропенією зі зсувом ядра вліво та лімфоцитозом. Влітку показники червоної крові не змінюються, а зазначений лейкоцитоз супроводжується нейтро- та моноцитозом на тлі лімфопенії. При іхтіофтиріозі коропа відзначається поліхромазія, анізоцитоз і лейкопенія, яка характеризується як лімфопенія, на тлі збільшення числа гранулоцитів та зсуву ядра нейтрофілів вліво.

Дактилогіроз сеголеток коропа, що викликається *Dactylogyrus vastator*, супроводжується поліхроматофільною анемією, моно-і лімфопенією на тлі еозинофілії. При некрозі зябер двохрічок коропа, викликаному *D. extensus*, виявлені поліхромазійна анемія, нейтро-, моно-, та лімфопенія та еозинофілія .

Дослідження, проведені при батріоцефаліз коропа, показали його високу патогенність, але специфічної однотипної картини крові, при досліджених рівнях зараження, нами не відзначено.

Поразка гемопоетичних органів при газопухирцевій хворобі призводить до функціональної еритро- та лейкопенії. [30-34]

Гостра форма аліментарного токсикозу лососів супроводжується мікроцитарною базофільною анемією, нейтро- та лімфопенією. Підгострий експериментальний Т-2 токсикоз коропа викликає нейтрофілоз зі зсувом ядра вліво, а хронічна інтоксикація риби – часткову анемію. Експериментальний гострий ДОН-токсикоз викликає еритро- та лейкопенію, яка супроводжується зниженням лімфоцитів (лімфопенія) та збільшенням еозіофілів .

Специфічних змін у картині червоної та білої крові при синдромі дефіциту енергії (СДЕ) або вертежі коропа не відзначається. Найбільш значуще зниження загального білка та зміни іонного складу (K^+ , Na^+ , Ca^{+2}) у сироватці.

Виявлені зміни в числі лейкоцитів розширюють уявлення про їх участь в імунній відповіді. Безсумнівно, що збудник шляхом як прямого впливу на організм риб, так і токсинами, що виділяються їм, продуктами метаболізму викликає у господаря збудження і в першу чергу лімфоїдно-мікрофагальної ланки. Зазначений лейкоцитоз (при ВПП, бронхіомікозі коропа, міксобактеріозі осетра та ін.) пов'язаний зі збільшенням числа таких імуноцитів, як моноцити та лімфоцити. При аеромоноз коропа в периферичному руслі відзначаються макрофаги, а при криптобіозі лосося ще ретикулярні і плазматичні клітини.

Одним із проявів неспецифічної реакції крові є анемія. Вона характеризується зниженням концентрації гемоглобіну та числа еритроцитів, торкаючись еритропоезу. Анемія, що спостерігається у риб, мала різний характер і ступінь тяжкості або стадії. [30-34]

Годівля риби комбікормом формує в організмі низку адаптивних реакцій. На прикладі вирощування товарного коропа, форелі та ремонтно-маткового стада

каспійського лосося показано, що за найсприятливіших умов годівлі комбікормом вміст гемоглобіну, число еритроцитів вони трохи нижче, а активність еритропоеза - вище, ніж в риби, що є природних кормах. Тобто, у таких випадках формується незначна компенсаторна аліментарна анемія 1 ступеня.

При аліментарному токсикозі у молоді лосося зниження гемоглобіну та числа еритроцитів відбувається у 1,5-2 рази. Останні більш ніж 50% представлені молодими формами. При цьому базофільні еритроцити значно менших розмірів (мікроцити), що свідчить про високу активність гемопоезу та масовий викид бластних форм з депо. Тобто вплив на рибу токсинів, що містяться в кормах, викликає анемію II ступеня, при цьому вміст гемоглобіну і число еритроцитів низьке; а еритропоез досить активний. У той же час зсув у числі лейкоцитів незначний, що свідчить про наявність резервів в організмі і оборотність анемії. Вищезгадані анемії пов'язані з порушенням обмінних процесів, у тому числі з порушеннями метаболізму білків і є регенеративними. [30-34]

Не менш цікава група анемії, що виникають на тлі зниження забезпеченості організму киснем внаслідок ураження органів дихання риби - тобто зябер та шкірних покривів. Серед них розрізняли анемію I ступеня при низьких рівнях зараження іхтіофтіріусами, дактилогірусами та хронічної інтоксикації Т-2 токсином.

Анемію II ступеня відзначали у коропа при ВПП, бронхіомікозі, некрозі зябер, викликаному дактилогірусами, у молоді осетрових – при міксобактеріозі, у лосося – при криптобіозі, тобто при гострих формах перебігу інфекційних та інвазійних захворювань. Вона характеризується анізоцитозом, поліхромазією та супроводжується різким зрушенням у числі лейкоцитів. [30-34]

Ураження органів кровотворення при гострому ДОН-токсикозі та ГПЛ призводить до анемії, яку можна віднести до функціональних. Вона супроводжується еритро- та лейкопенією, без патологічних змін у морфології клітинних елементів периферичної крові.

Тривалий премортальний стан, що спостерігається нами при бронхіомікозі та аеромонозі коропа, криптобіозі лосося, пов'язаний з формуванням гострих гемолітичних анемії (III ступеня). Вони характеризуються не тільки низьким рівнем гемоглобіну та числа еритроцитів, а й масовим гемолізом клітин крові, який виникає в одних випадках внаслідок безпосереднього впливу на еритроцити патогенного фактора (збудника), в інших – під дією гемолітичної отрути або гемолізинів, які, мабуть можуть вироблятися так само в організмі риб у відповідь на присутність патогенів або продуктів їх метаболізму. [30-34]

При різних патологічних станах у крові можна зустріти морфологічно змінені клітинні елементи (як еритроцити, і лейкоцити).

Гіперсегментацію ядра у базофілів коропа при ЗПС, у нейтрофілів при криптобіозі лосося. Хроматоліз, пікноз, каріорексис та інші патології ядра та лізис клітин характерні для гемолітичної анемії при бронхіомікозі коропа, криптобіозі лосося, міксобактеріозі осетра.

Вакуолізація - це одна з найбільш поширених патологій, що зустрічається як в ядрі, так і в цитоплазмі. Наявність її в ядрі вказує на тяжкість процесу. Це найпоширеніша патологія може поєднуватися з іншими структурними змінами клітин. У периферичній крові риб вакуолізація клітин відзначається як при захворюваннях, а й при стресі. [30-34]

Зміна зернистості гранулоцитів виникає при різних захворюваннях. При цьому може змінюватися форма, розміри та колір гранул. Ми спостерігали зміни форми та кольору гранул нейтрофілів при іхтіофтиріозі та у псевдоеозинофілів при мікотоксикозі коропа.

Іншою областю успішного застосування гематологічних досліджень є використання їх для характеристики відносин у системах паразит – господар. У основі лежить з одного боку ступінь патогенності збудника, з іншого

фізіологічний стан господаря. Патогенність збудника зазвичай корелює з еволюційним віком системи.

Антропогенний прес впливає на взаємини між збудником і рибою. Змінюючи ступінь патогенності, вірулентності збудників і навіть специфічність паразитів, він, за умов аквакультури, сприяє формуванню низки адаптивних, котрий іноді стресових реакцій крові господаря, призводить до зниження його резистентності. [30-34]

При простеженні характеру взаємовідносин у 4 паразито-господарських системах: *Ichthyophthirius* - короп, *Dactylogyrus vasta* - короп, *Dactylogyrus extensus* - короп і *Bothriocephalus opsari - ichthydis* – короп, вирішуються дві задачі. Перша – з'ясовують патогенну дію паразитів на організм коропа. Друга - визначають рівень інтенсивності інвазії, при якому у риби ще не спостерігається суттєвих відхилень фізіологічних показників. Для цього, крім гематологічних показників, використовують біохімічні, морфологічні та рибоводні параметри.

Характер взаємовідносин у системах іхтіофтиріус - короп і дактилогірус - короп склався в тривалій спільній еволюції і перебуває у взаємній рівновазі. Їх паразитування у невеликій кількості викликає лише ряд адаптивних змін у картині крові. При вирощуванні риби в аквакультурі фактори антропогенного впливу та інші причини призводять до зниження резистентності та реактивності господаря. Відбувається порушень рівноваги у системі на користь паразита, виникають спалахи чисельності збудника, які без терапевтичного втручання призводять до захворювань та навіть загибелі коропа. [30-34]

Отримані результати модельних експериментів від риб із різним рівнем зараженості цими паразитами піддаються різноманітній статобробці.

Метод кластерного аналізу дозволяє розподілити весь масив даних на групи, в яких певний рівень зараженості паразитами викликає подібні відхилення в картині крові. У єдину групу об'єднуються особини із близькими змінами

фізіолого-біохімічних показників. Оскільки в аналізованому матеріалі є контрольна, незаражена група риб, то до неї приєднуються особини з мінімальними відхиленнями в організмі, а наявний у них рівень зараженості може вважатися прикордонним. [34]

Наявність прикордонних інтенсивностей інвазії, що викликають мінімальні відхилення в організмі, для риб різної маси дозволяє об'єднати ці два показники в один стандартний коефіцієнт. Цим методом були оброблені первинні дані, отримані від цьогорічок коропа, заражених *D. vastator* і двохрічок, заражених *D. extensus*. Порогова величина ДІВ для дактилогірозу – 2,5. Якщо отриманий ДІВ буде більшим або дорівнює 1,7 – при зараженні іхтіофтиріусами або 2,5 – при виявленні дактилогірусів, то це вказує на захворювання і необхідно розпочинати лікувальну обробку. При значеннях менше 1,7 і 2,5 (відповідно) у риби відмічено паразитозисство, що дозволяє почекати з обробкою, але обов'язково проводити систематичний контроль за зростанням зараженості. [34]

Дослідження, проведені на коропі, зараженому ботріоцефалюсом, виявили його високу патогенність. Паразитування навіть одного гельмінта викликає відхилення у картині крові. Проведення кластерного та дискримінантного аналізів показали, що жоден із об'єктів вибірки з низьким рівнем зараженості не об'єднався із незараженою групою риб. Ймовірно, це можна пояснити тим, що система ботріоцефалюс - короп незбалансована і навіть взаємоагресивна, так як має менш давній зв'язок. Відомо, що цей гельмінт адаптований практично до всіх коропових, але до завезення його в водойми Європи, Кавказу та Середньої Азії, природно, не міг паразитувати на багатьох представниках цього сімейства. Перехід його на коропа стався досить швидко, викликаючи в шістдесяті роки гостру форму перебігу хвороби і навіть загибель господаря. В даний час гостра форма ботріоцефальозу вкрай рідкісна, однак, присутність його як у ставкових, так і в тепловодних господарствах призводить до втрати рибопродуктивності від 10 до 50%. Враховуючи сказане вище, при

виявленні цього гельмінта необхідно проводити дегельмінтизацію. Терміни її залежать від типу господарства, температури води та стадії розвитку паразита.

Впровадження високоінтенсивних технологій потребує суворого виконання технологічних норм. Їх порушення призводить до низки незаразних хвороб. Одним із таких захворювань є вертіж коропа, або синдром дефіциту енергії (СДЕ). Він виникає під час або частіше в кінці зимівлі коропа в тепловодних садових та басейнових господарствах та супроводжується високою смертністю. Гематологічний аналіз у хворих риб не виявляє значних відхилень у картині крові. У той самий час відбувається різке зниження білка сироватці, зміна іонного складу у ній, підвищення вологості тіла риби та різке зниження жиру та білка в ньому. Короп із СДЕ має енергетично недостатній рівень резервів, і в ситуаціях, пов'язаних з високими навантаженнями, він не може зберігати енергетичну рівновагу. [35-37]

З метою профілактики СДЕ слід проводити систематичний контроль за фізіологічним станом риби, що зимує на теплій воді. Для діагностики СДЕ добре зарекомендував себе комплекс показників: коефіцієнт вгодованості, вологість тіла, білка в сироватці та провокаційна біопроба на температурний стрес. Щомісячне проведення цієї роботи в ході зимівлі, починаючи з січня, дозволяє своєчасно виявити СДЕ та вжити необхідних заходів для усунення енергетичної недостатності. Ефективність цих робіт оцінюється за запобіганням збиткам і становить по різних господарствах від 80 до 100%.

Велика група незаразних хвороб риб пов'язана також із споживанням неякісних або неповноцінних за складом кормів. Токсичний ефект корму може виявлятися при високих дозах токсиканту досить швидко і супроводжується масовою загибеллю риб, за низьких - реакція формується поступово, з часом.

Високі дози, які значно перевищують ГДК, викликають гострі токсикози і призводять до швидкої загибелі риб. Поступове накопичення в організмі мікотоксинів у хронічних дослідах спричиняє гальмування росту, зрушення у

фізіолого-біохімічних показниках, зниження резистентності. Лососеві риби мають підвищену чутливість до неякісних кормів. Спостереження за фізіологічним станом каспійського лосося показали, що використання токсичних або середньотоксичних кормів викликає у нього мікроцитарну базофільну анемію, що супроводжується потемнінням у риб шкірних покривів, зблідненням зябер і внутрішніх органів, недокрів'ям. [30-34]

IV ДИНАМІКА РІВНЯ ФІБРИНОГЕНА В КРОВІ РИБ ПІД ВПЛИВОМ СТРЕСА

Дослідження важливі як в сучасній ветеринарії, що нещодавно перейшли на нову сходинку розвитку, так і в промисловому рибництві, зацікавленому в тривалому збереженні життя самих продуктивних тварин. У зв'язку з цим, актуальна альтернативна оцінка стану здоров'я промислових риб по показникам системи гемостазу і запобігання їх смертності у промислових та декоративних умовах [12].

Як стрес-фактори у риб виступають абіотичні фактори зовнішнього середовища, фактори внутрішнього середовища, соціальні фактори, антропогенні фактори. Стрес-реакції у риб викликаються здебільшого катехоламінами і кортизолом, які діють протягом двох різних, але стикаються один з одним, відрізків часу [32]. Кількісна характеристика кортикальної відповіді риб залишається недостатньо вивченою.

Існує велика база зарубіжних досліджень, що стосуються впливу різних видів стресу на промислових і диких риб [3, 4, 5, 6, 7, 8], у більшості з яких було експериментально зафіксовано зміна концентрації кортизолу в плазмі крові. Серед цих робіт можна відзначити експеримент по впливу на сазана *C. carpio* десяти різних видів забруднювачів сублетальних концентраціях, в результаті чого концентрація глюкози і кортизолу сироватки крові швидко підвищувалися [9]. Навпаки, рівень кортизолу, глюкози і деяких інших гематологічних показників значно не змінилися в результаті транспортування звичайного коропа *C. carpio*, причому зазначено, що попередні маніпуляції виявилися набагато суттєвішим стресовим фактором [10]. Варто також відзначити дослідження, в результаті яких була відзначена активація гемостатичних механізмів у риби при стресі, що включає швидке зниження часу згортання крові зі збільшенням числа тромбоцитів

З інших джерел відомо, що стрес, який відтворюється шляхом вилову та маніпуляцій, знижує рівень фібриногену у крові разом з збільшенням числа тромбоцитів. Такі результати, на думку дослідників, підтверджують, що час згортання є добрим індикатором стресу, а його зменшення можливо через збільшення числа тромбоцитів крові, викликаного підвищенням рівня катехоламінів та кортизолу, що виділяються під час стресу [11].

Роботи з оцінкою кортизолу крові риб під впливом стресу дуже нечисленні, лише в недавньому дослідженні по впливу гіпоксичного стресу на *C. carpio*, простежувалася зміна рівня кортизолу відповідно зі стадіями класичного адаптаційного синдрому [3]. Можна зустріти твердження, що у риб час згортання крові - досить нестабільний показник, який залежить не тільки від способу взяття крові, а й від факторів зовнішнього середовища, фізіологічного стану риби [12].

Для проведення експерименту використовували 8 коропів (*Cyprinus carpio*). У якості комплексного стрес-фактора виступили маніпуляції по забору крові у риб, що супроводжувалися тотальною гіпоксією, а також подальше перекриття надходження розчиненого кисню в воду в течія наступних днів експерименту [3]. Забір крові проводився шприцом із хвостової артерії. Для дослідження рівня фібриногену – у пластикові пробірки, що містять 3,8%-ний розчин цитрату натрію у співвідношенні 1:9 [1], для аналізу стрес- маркерів – у пластикові пробірки без антикоагулянту. Взяття крові згідно методики проведення гострого експерименту для риб здійснювалося негайно після акліматизації і далі через 24, 48, 72 і 96 годин після впливу стрес- фактор, а дослідження крові проводили не пізніше двох годин після її забору.

Концентрацію кортизолу в плазмі крові встановлювали методом твердофазного хемілюмінесцентного імуноаналізу. Кількісний аналіз фібриногену визначали за допомогою коагулометра [13].

Значення отриманих результатів в роботі представлені в вигляді середньої

величини і стандартної помилки ($M \pm m$).

Достовірність відмінностей показників фібриногену і кортизолу коропів з за допомогою критерію Вілкоксона для залежних вибірок. Результати дослідження зі значенням ймовірності припущення альфа-помилки, рівні або менше 5% ($p < 0,05$), розцінювалися як статистично значущі. Різницю двох показників вважали достовірним, якщо воно дорівнювало або перевищувало свою середню помилку різниці у два і більше разів.

Якісну інтерпретацію сили зв'язку між стрес-реакціями і показниками коагулограми виконували за отриманим значенням R на основі шкали Чеддока.

З метою оцінки стресорної реакції коропів при зниженні рівня кисню в воді були визначено два показника (стрес-маркера): кортизол і гемоглобін. У результаті проведеного експерименту було зазначено, що рівень кортизолу плазми на 1-й і 3-й дні після впливу стрес-факторів достовірно відрізняється від 2-го дня, а до 4-му дню рівень кортизолу помітно знизився (табл. 4.1).

Таблиця 4.1 – Динаміка рівня кортизолу та гемоглобіну крові риб в ході експерименту (з першого по четвертий дні)

Показник	1 день, n=8	2 день, n=8	3 день, n=8	4 день, n=8
Кортизол, нг/мл	287,2±28,9**	118,9±56,6* ***	333,6±65,2**	211,8±112,2
Гемоглобін, г/л	89,1±2,12*****	80,3±9,8* ****	-	52,9±1,9* **
* - відмінності достовірні з першим вдень досліджень ($p \leq 0,05$) ** - відмінності достовірні зі другим вдень досліджень ($p \leq 0,05$) *** - відмінності достовірні з третім вдень досліджень ($p \leq 0,05$) **** - відмінності достовірні з четвертим вдень досліджень ($p \leq 0,05$).				

Дані зміни можливо зіставити з класичною стадійністю стресу, в якій 1-

й і 2-й дні експерименту відповідають першим стадіям (тривоги), в 3-й день при значному збільшенні рівня кортизолу плазми проявляється стадія резистентності, а різке його зниження до 4-му дні узгоджується зі стадією виснаження, коли компенсаторні процеси організму вичерпані, а корисно-приспосувальний ефект не досягнуто [3].

Також було встановлено, що концентрація гемоглобіну крові на 1-й, 2-й та 4-й дні досліджень в умовах гіпоксії, в результаті яких 1-й день вона достовірно відрізнялася від 2-го і 4-го дня. Помітне очевидне зниження цього хромопротеїду в крові піддослідних тварин протягом днів експерименту. Швидше за все, цей ефект викликаний крововтратою, пов'язаною з взяттям крові на дослідження щодня, разом з цим не виключається вплив кортикостероїдів на рівень цього показника.

4.1 Вивчення динаміки рівня фібриногену у крові коропів при гіпоксії.

Фібриноген – важливий функціональний показник системи плазмового гемостазу, що забезпечує утворення згустку, у досліджених тварин в 3-й день експерименту мав достовірні відмінності від 1-го і 4-го дня. З даних таблиці 4.2 видно, що у 4-ий день впливу стрес-факторів кількість фібриногену крові значно виросло.

Кореляційний аналіз виявив наявність тісної зворотної кореляційної зв'язку між показниками стрес-реакцій - гемоглобіном і кортизолом, де коефіцієнт кореляції склав $-0,7$. Модель регресії при аналізі залежності цих показників вийшла найбільш якісною (R^2 склав $0,44$). Графічне зображення кореляційної залежності стрес-маркерів представлено на рисунку 4.1.

Таблиця 4.2 – Динаміка рівня фібриногену крові риб у ході експерименту

Показник	1 день, n=8	2 день, n=8	3 день, n=8	4 день, n=8
Фібриноген, г/л	1,3±0,2**	1,3±0,4	1,0±0,2* ***	2,0±0,1**
* - відмінності достовірні з першим вдень досліджень ($p \leq 0,05$) ** - відмінності достовірні з третім вдень досліджень ($p \leq 0,05$) *** - відмінності достовірні з четвертим вдень досліджень ($p \leq 0,05$).				

Аналізуючи ці дані, можна відзначити, що обидва стрес-маркера достатньо сильно взаємопов'язані, що уможливорює застосування будь-якого з них для ідентифікації стресових умов

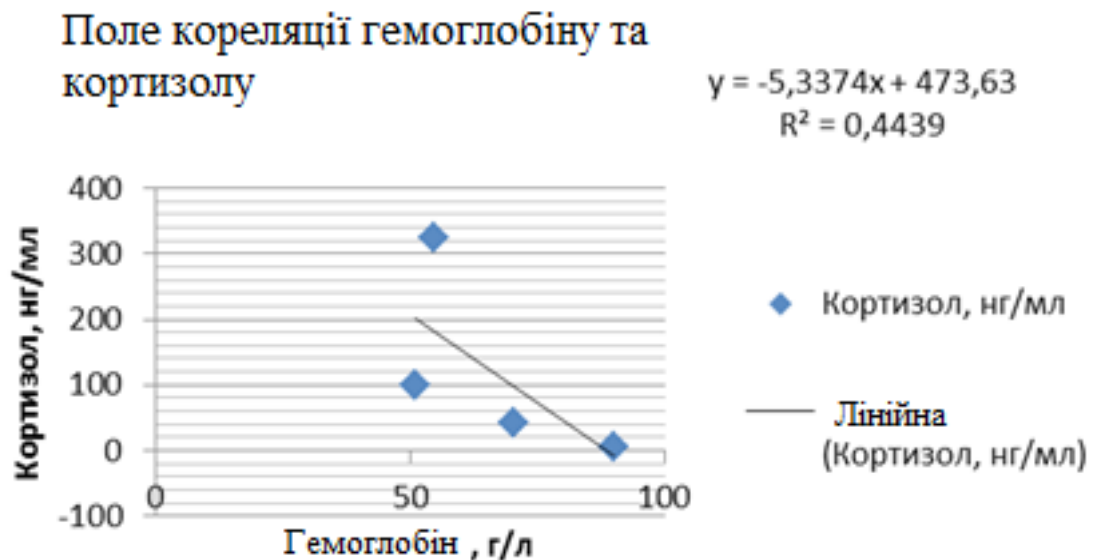


Рисунок 4.1 - Графічне зображення кореляційної залежності та регресійні моделі, описують взаємодії стрес-маркерів

Кореляційний аналіз також виявив наявність зв'язків середнього та високого ступеня між рівнем фібриногену і вмістом стрес-маркерів в сироватці

крові у коропів. Так, коефіцієнт кореляції (R) між фібриногеном і кортизолом складає $-0,30$, що вказує на зворотну залежність між кількістю кортизолу і фібриногену. Даний факт може вказувати на зниження згортаючої здібності крові риб під впливом стресу, коли рівень кортизолу зростає.

У той же час, чим нижчий вміст гемоглобіну, тим нижчий і рівень фібриногену ($R= 0,7$), що знову ж таки призводить до зниження швидкості зупинки кровотечі при стресі.

Аналізуючи динаміку рівня кортизолу крові після дії комплексу стрес-факторів на досліджуваних риб (у 1-й день експерименту - $287,2 \pm 28,9$ нг/мл; у 2-й день - $118,9 \pm 56,6$ нг/мл; у 3-й день - $333,6 \pm 65,2$ нг/мл та у 4-й день - $211,8 \pm 112,2$ нг/мл), можна провести відповідність його коливань з класичною стадійністю стресу. Також очевидне зниження концентрації гемоглобіну в крові впродовж експерименту (у 1-й день - $89,1 \pm 2,12$ г/л, у 2-й день - $80,3 \pm 9,8$ г/л, у 4-й день - $52,9 \pm 1,9$ г/л). За збільшенням кількості фібриногену крові впродовж днів експерименту (в 1-й день - $1,3$ г/л, 2-й день - $1,3$ г/л; 3-й день - $1,0$ г/л і 4-й день - $2,0$ відповідно) можна говорити про процеси коагуляції, які прискорилися під впливом гіпоксії.

Кореляційно-регресійний аналіз показує, що обидва стрес-маркера (кортизол і гемоглобін) достатньо сильно взаємопов'язані, що робить можливим застосування будь-якого з них для ідентифікації стресових умов.

Також важливо відзначити наявність зв'язків середнього та високого ступеня між показником вторинної ланки гемостазу і змістом стрес-маркерів в сироватці крові у коропів, а саме - виявлено пряма кореляція гемоглобіну з рівнем фібриногену та зворотний зв'язок кортизолу з рівнем фібриногену, при цьому коефіцієнт кореляції $0,7$ і $-0,3$ відповідно. У зв'язку з цим кількість фібриногену також можна використовувати як біоіндикатор критичних для риб умов.

V АДАПТИВНА ІМУННА СИСТЕМА У РИБ

Імунна система всіх щелепних хребетних складається з двох основних підсистем: вродженої (неспецифічної) і адаптивної (специфічної) імунної системи. Вроджена імунна система першою реагує на інфекційні агенти; однак він не забезпечує тривалого захисту. Адаптивна імунна система активується пізніше і реагує на патогени зі специфічністю та пам'яттю. Основні компоненти адаптивної імунної системи, включаючи Т-клітинні рецептори (TCR), головний комплекс гістосумісності (МНС), імуноглобуліни (Igs) і ген, що активує рекомбінацію (RAG), виникли у риб з першою щелепою (хрящові та кісткові). У цьому огляді досліджуються та обговорюються компоненти адаптивної імунної системи кісткових риб і останні розробки в порівняльній імунології. Подібно до ссавців, адаптивна імунна система кісткових риб розділена на два компоненти: клітинно-опосередковані відповіді та гуморальні реакції. Т-клітини, основні елементи клітинно-опосередкованої адаптивної імунної відповіді, диференціюються в ефекторні Т-клітини-хелпери (Th) або ефекторні цитотоксичні Т-клітини (ЦТЛ). Центральні елементи, що беруть участь у диференціації підмножин Th у ссавців, цитокіни та головні фактори транскрипції, також були ідентифіковані у кісткових риб. Крім того, кожна підгрупа Th-клітин, визначена певним цитокіном для контролю імунних відповідей, була описана у кісткових риб. Подібно до ссавців, ЦТЛ сприяють клітинній цитотоксичності кісткових риб. В-клітини є центральними гравцями в гуморально-опосередкованому адаптивному імунітеті шляхом вироблення опсонізуючих, нейтралізуючих і комплементзв'язуючих антитіл і індукування антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC). Три класи антитіл під назвами IgM, IgD та IgT/Z були охарактеризовані у кісткових риб. Наявність адаптивної імунної системи та, як наслідок, імунної пам'яті у кісткових риб дозволяє вакцинацію,

найбільш відповідний метод боротьби з хворобами в аквакультури. Імунологічні дослідження на рибах забезпечують комплексну оцінку імунної системи риб, що є вирішальним для розуміння еволюції імунної системи ссавців. [38-40]

Усі щелепні хребетні, включаючи хрящових і костистих (кісткових) риб, мають спільні фундаментальні основи імунної системи, яка складається з двох основних частин: вродженої (неспецифічної) і адаптивної (специфічної) імунної відповіді. Вроджений імунітет, перша лінія захисту. Система розпізнає патогени неспецифічним чином і створює швидку реакцію для знищення мікробів, але не забезпечує довгострокового захисту. Якщо вроджена імунна система недостатня для очищення інфекційних агентів, адаптивний імунітет активується неспецифічним імунітетом і перешкоджає патогенам, реагуючи зі специфічністю та тривалим захистом (пам'яттю). Адаптивна імунна система складається з високоспеціалізованих клітин, Т- і В-лімфоцитів і білків, які знищують і пригнічують ріст загартників. На відміну від вродженого імунітету, адаптивні імунні відповіді ґрунтуються на дуже різноманітних антигенспецифічних рецепторах, які експресуються на Т- і В-клітинах декількома сотнями генних елементів, кодованих зародковою лінією, які зібрані за допомогою механізмів соматичної гіпермутації та рекомбінації змінної (V), різноманітність (D) і з'єднання (J) сегментів генів. Таким чином, адаптивна імунна система має виняткову специфічність для багатьох різних патогенів. Іншою ключовою властивістю адаптивного імунітету є пам'ять, оскільки адаптивна імунна система генерує клітини пам'яті, які забезпечують довготривалий специфічний імунітет, таким чином відіграючи вирішальну роль у захисті від рецидивуючих інфекцій із швидкою та ефективною відповіддю на ті самі збудники. [38-40]

Хрящові та кісткові риби є найдавнішою групою хребетних, яка містить основні принципи імунітету, подібні до ссавців, незважаючи на певні відмінності між ними. Незважаючи на те, що кісткові риби включають приблизно 50% усіх видів хребетних, більшість досліджень з імунології риб були проведені протягом

останніх десятиліть. Раніше ми висвітлювали нещодавні знання про вроджені імунні відповіді та антигенпрезентуючі клітини (APC) у кісткових риб.

5.1 Адаптивний імунітет у риб

Основні специфічні компоненти адаптивної імунної системи, такі як рецептори Т-клітин (TCR), головний комплекс гістосумісності (MHC), імуноглобуліни (Igs) і ген, що активує рекомбінацію (RAG), з'явилися приблизно 450-500 мільйонів років тому у першощелепних риб (хрящові та кісткові) (табл. 5.1). Як і у ссавців, адаптивний імунітет кісткових риб поділяється на два основні компоненти: клітинну та гуморальну відповіді (рис. 5.1).

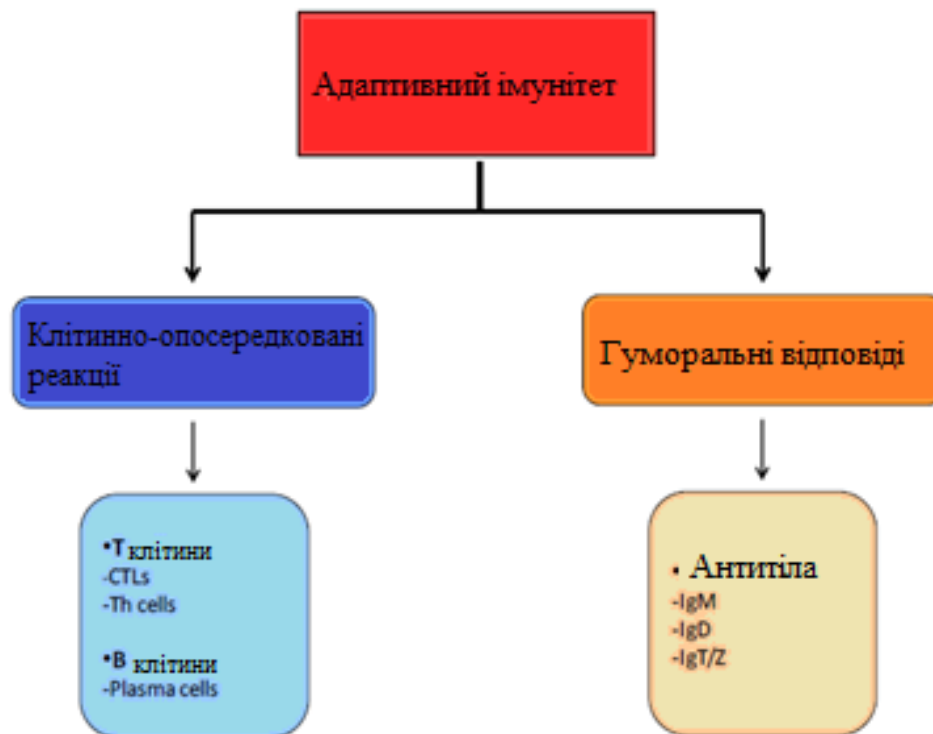


Рисунок 5.1 - Компоненти адаптаційного імунітету кісткових (кісткових) риб. Адаптивна імунна система кісткових риб складається з двох основних компонентів: 1) клітинно-опосередковані реакції, 2) гуморальні відповіді.

Таблиця 5.1 - Порівняльна оцінка загальноприспосувальних компонентів імунітету між кістковими рибами та ссавцями

	Кісткові риби	Ссавці
Т та В клітини	+	+
BCR	+	+
TCR	+	+
Механізм різноманітності	V(D) рекомбінація	V(D)J рекомбінація
RAG гени	+	+
AID	+	+
SHM	+	+
Зародковий центр	+	+
CSR	+	+
Ig ізотипи	IgM, IgD, та Ig T/Z	IgM, IgD, IgG, IgE та IgA

Т-клітини, ключові елементи клітинного адаптивного імунітету, дозрівають у тимусі та диференціюються в ефекторні клітини, включаючи цитотоксичні Т-клітини (CTL) або хелперні Т-клітини (Th). Хоча В-клітини, ключові елементи гуморального адаптивного імунітету, походять із кісткового мозку ссавців, вони виробляються в передній нирці кісткових риб і диференціюються в плазматичні клітини, які виробляють антитіла. Антитіла можуть бути присутніми у двох різних формах: розчинна форма, відома як імуноглобуліни (Igs), і мембранно-зв'язана форма, відома як В-клітинний рецептор (BCR). [38-40]

BCR і TCR, що експресуються на В- і Т-клітинах, є антиген-специфічними рецепторами, утвореними рекомбінацією V(D)J і соматичною гіпермутацією. Реаранжування генів V(D)J у різних комбінаціях генерує широке розмаїття специфічностей антиген-рецептор. Білки, кодовані генами, що активують рекомбінацію (RAG1 і RAG2), опосередковують реаранжування гена V(D)J шляхом розпізнавання сигнальних послідовностей рекомбінації (RSS) і

розщеплення цільової ДНК. Сегменти гена V(D)J присутні в кісткових рибах, таких як даніо, райдужна форель і фугу. Крім того, експресія генів RAG1 і RAG2 була виявлена у кісткових риб, а перебудова гена V(D)J у кісткових риб залежить від білків RAG. Крім того, соматична гіпермутація у ссавців ініціюється ферментом, індукованим активацією цитидиндезаміназою (AID), який також експресується в кісткових рибах. На додаток до утворення TCR і BCR, ці механізми індукують незворотні зміни в ДНК кожної клітини, і нащадки цих клітин успадковують гени, які кодують ту саму рецепторну специфічність, включаючи Т- і В-клітини пам'яті, які забезпечують довголіття. специфічний імунітет. [38-40]

На додаток до антигенної специфічності, імунологічна пам'ять визначається як фундаментальна особливість адаптивної імунної системи. Більшість специфічних імунних клітин гине після очищення від патогенів, що вторглися, але невеликий відсоток клітин дає початок довгоживучим клітинам пам'яті, які опосередковують швидку та захисну імунну відповідь проти патогенів, які раніше зустрічалися. Ефективна імунізація ґрунтується на поєднанні антигенної специфічності та пам'яті в адаптивному імунітеті. Як і у ссавців, Т- і В-клітини пам'яті були ідентифіковані у кісткових риб. Проліферація Т-клітин пам'яті була описана у імунізованих коропів за допомогою модуляції ІЛ-10.

5.2 Клітинно-опосередковані реакції в адаптивному імунітеті риб

Т-клітини відіграють фундаментальну роль у клітинно-опосередкованих реакціях адаптивного імунітету, залучаючи регуляцію інших функцій лейкоцитів або безпосередньо знищуючи інфіковані клітини-хазяїни. Т-клітини розвиваються в тимусі; тому їх ще називають тимоцитами. Фактори транскрипції для розвитку Т-клітин у кісткових риб, такі як ікарос (експресується ранніми Т-

клітинами) і Iск (експресується пізніше в розвитку). На додаток до молекулярних механізмів, клітинні механізми розвитку Т-клітин зберігаються у щелепних хребетних. Нещодавно розвиток Т-клітин у кісткових риб було всебічно розглянуто в іншому місці. Зрілі Т-клітини присутні в лімфоїдних тканинах кісткових риб, таких як тимус, нирки, селезінка та пов'язані зі слизовою оболонкою лімфоїдні тканини, включаючи кишечник, шкіру та зябра. [40]

Усі Т-клітини мають TCR, утворений RAG-опосередкованою перегрупованням гена V(D)J, і розпізнають специфічні антигени. У ссавців TCR є трансмембранним глікопротеїном типу I з коротким цитоплазматичним хвостом і пов'язаний із комплексом CD3, трансмембранним білковим комплексом із внутрішньоклітинним сигнальним доменом (мотив активації на основі імунорецепторного тирозину (ITAM)), який утворює TCR:CD3 комплекс (Birnbaum et al., 2014; Love & Hayes, 2010). Структура комплексу TCR:CD3 зберігається у ссавців і кісткових риб (Castro та ін., 2011; Øvergård та ін., 2009; Shang та ін., 2008). Крім того, Т-клітини у ссавців є присутні головним чином у двох підлініях на основі природи гетеродимерних рецепторних ланцюгів з TCR: $\alpha\beta$ -TCR або $\gamma\delta$ -TCR (Smith et al., 2019). Більшість Т-клітин експресують $\alpha\beta$ -TCR, знайдений у крові та лімфоїдних органах, тоді як $\gamma\delta$ -Т-клітини становлять невелику частку загальної популяції Т-клітин у ссавців (~5 %). Подібно до ссавців, гени TCR кодують ланцюги TCR α , β , γ і δ у кісткових риб, таких як каналний сом, даніо-зебра та атлантичний лосось. Крім того, $\gamma\delta$ -Т-клітини складають 7-20% від загальної кількості лімфоцитів у крові та лімфоїдних тканинах даніо. [38-40]

Хоча $\gamma\delta$ -Т-клітини розпізнають антигени безпосередньо, $\alpha\beta$ -Т-клітини розпізнають пептиди антигенів, зв'язаних з молекулами головного комплексу гістосумісності (МНС). $\alpha\beta$ -Т-клітини у ссавців далі поділяються на дві основні популяції на основі їх функції: цитотоксичні CD8⁺ Т-клітини (CTL) і хелперні CD4⁺ Т-клітини (Th). CD8⁺ Т-клітини активуються пептидами, отриманими з

внутрішньоклітинних антигенів і представленими молекулами МНС класу I, і їх функція полягає в тому, щоб вбивати інфіковані клітини-хазяїни. Т-клітини-хелпери CD4⁺ стимулюються пептидами, отриманими з позаклітинних антигенів і представленими молекулами МНС класу II, і вони регулюють відповіді інших лейкоцитів. Функціональна роль як Т-клітин, так і споріднених з Т-клітинами молекул, CD4, CD8, МНС класу I і II, була описана у кісткових риб. [40]

5.3 Основний комплекс гістосумісності та активація наївних Т-клітин

Молекули головного комплексу гістосумісності (МНС) класів I і II відіграють ключову роль в адаптивному імунітеті. Молекули МНС класу I складаються з двох доменів ($\alpha 1$ і $\beta 2$), що утворюють антигензв'язувальну платформу, і одного домену, що охоплює мембрану ($\alpha 3$). Домен мікроглобуліну ($\beta 2$) нековалентно зв'язаний з доменом, що охоплює мембрану. З іншого боку, область зв'язування молекул МНС класу II утворена доменами $\alpha 1$ і $\beta 1$, а два домени, що охоплюють мембрану ($\alpha 2$ і $\beta 2$), присутні в молекулі МНС класу II. Хоча обидва гени МНС класу I та II були описані у більшості костистих риб і збереглися у щелепних хребетних, у деяких костистих риб, таких як атлантична тріска, відсутні гени МНС класу II. Однак у атлантичної тріски було ідентифіковано більше генів, пов'язаних з молекулами МНС класу I, щоб компенсувати відсутність аналогів МНС класу II порівняно з іншими кістковими рибами. Крім того, гетеродимерні комплекси та консервативна структура для зв'язування пептиду з лігандом молекул МНС у кісткових риб подібні до тих, що зустрічаються у ссавців. [40]

У ссавців молекула МНС класу I експресується всіма ядерними клітинами та представляє пептиди з внутрішньоклітинних антигенів CD8⁺ Т-клітинам (цитотоксичним Т-клітинам). Однак молекула МНС класу II представляє пептиди, процесовані з ендоцитованих/фагоцитованих антигенів (позаклітинних

антигенів) лише на професійних APC, дендритних клітинах, макрофагах і В-клітинах до CD4⁺ Т-клітин (хелперних Т-клітин). Подібно до ссавців, молекули МНС класу II експресуються всіма професійними APC костистих риб. Однак молекули МНС класу I повсюдно експресуються та виявляються в багатьох тканинах, включаючи селезінку та передню нирку. Крім того, роль молекул МНС I і II кісткових кісток подібна до ролі у ссавців. Для, наприклад, після стимуляції антигеном експресія обох генів МНС класу I і II була підвищена в кісткових рибах, подібно до ссавців. Крім того, підвищена експресія генів МНС класу I і II підвищила виживаність і стійкість атлантичного лосося до інфекції *Aeromonas salmonicida*. Крім того, збільшення експресії генів МНС класу II та CD4 корелює з посиленою адаптивною імунною відповіддю на живі ослаблені вакцинні штами *Edwardsiella ictaluri* (*E. ictaluri*) у лімфоїдних органах каналного сома.

Крім того, взаємодії між TCR і МНС: пептидним комплексом на APC бракує достатнього сигналу для активації повністю наївних Т-клітин у ссавців. Тому для праймування Т-клітин необхідна комбінація трьох різних сигналів, що подаються послідовно: 1) розпізнавання антигену (TCR:МНС), 2) костимуляція та 3) цитокіни (рис. 5.2). [41]

Костимулюючий сигнал генерується взаємодією костимулюючого фактора CD28, що експресується на Т-клітинах, і лігандів B7.1 (CD80) і B7.2 (CD86), знайдених на APC. Як третій сигнал, цитокіни, що виділяються APC, визначають диференціювання активованих Т-клітин у певну підмножину ефекторних Т-клітин. Подібно до ссавців, костимулюючі молекули (CD28, B7.1 і B7.2) були ідентифіковані в кількох костистих рибах, таких як райдужна форель і даніо. Цитокіни для диференціації Т-клітин були визначені у кісткових риб, подібних до ссавців.

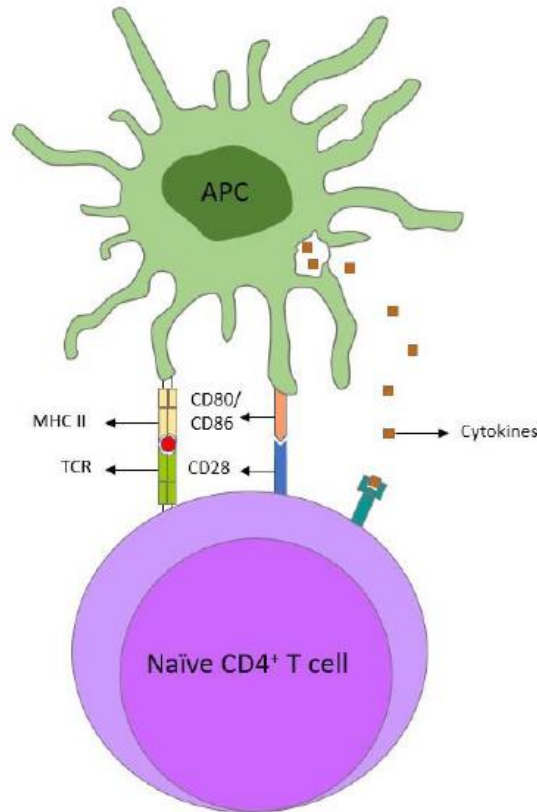


Рисунок 5.2 - Три сигнали, що доставляються APC до первинних наївних Т-клітин. Сигнал 1 генерується в результаті взаємодії між МНС: пептидним комплексом і TCR і необхідний для активації наївних Т-клітин. Сигнал 2 є костимулюючим сигналом (CD80/CD96:CD28), який доставляється тим самим APC для виживання та проліферації Т-клітин. Сигнал 3 є сигналом цитокіну.

Цитокіни секретиуються APC та іншими вродженими лімфоцитами для диференціювання Т-клітин у певний підтип.

Ефекторні CD4⁺ Т-хелперні клітини. CD4⁺ Т-клітини виконують численні важливі функції у ссавців шляхом стимуляції клітинно-опосередкованого імунітету макрофагів, гранулоцитів (нейтрофілів, еозинофілів і базофілів), CD8⁺ Т-клітин і В-клітин для вироблення антитіл шляхом виробництва кількох цитокінів. Подібні функції Т-клітин CD4⁺ були описані у кісткових риб: зокрема, ефективне знищення бактерій, викликане CD4⁺ Т-

клітинами коропа гінбуна. Крім того, підвищення регуляції цитокіну, IL-12, пов'язаного з CD4⁺ Т-клітинами, було задокументовано у *fugu* під час позаклітинної паразитарної інфекції. Хоча молекула CD4 ссавців містить чотири Ig-подібні домени (D1-D4), кісткові риби мають два гени CD4: CD4-1 містить чотири Ig-подібні домени та CD4-2 містить два або три Ig-подібні домени. Нещодавно ми показали підвищену експресію генів CD4-1 і CD4-2 в лімфоїдних тканинах каналного сома, інфікованого штамами *E. ictaluri*. [40-42]

Після активації наївні CD4⁺ Т-клітини диференціюються в специфічні підмножини, які називаються клітинами Th1, Th2, Th9, Th17, Tfh і Tregs, причому кожна підгрупа визначається певним цитокіновим профілем контролю над імунною відповіддю (рис. 5.3).

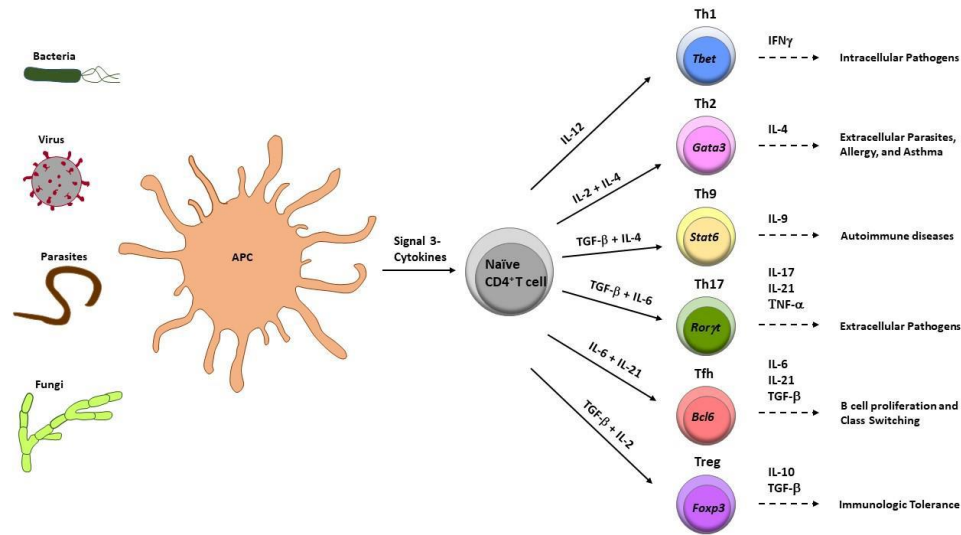


Рисунок 5.3 - Індукована патогеном диференціація наївних CD4⁺ Т-клітин на різні підгрупи. Після взаємодії з APC, інфікованим різними патогенами (бактеріями, вірусами, паразитами або грибками), Th-клітини можуть диференціюватися в кілька підмножин ефektorних клітин залежно від сигналу цитокіну (суцільні стрілки). Кожен тип Th секретує унікальний набір цитокінів (штрихові стрілки) і стимулює специфічні для патогенів імунні відповіді.

У ссавців APC, активовані через рецептори розпізнавання образів, виробляють велику кількість інтерлейкіну 12 (IL-12), який спонукає природні клітини-кілери (NK) до секреції інтерферону γ (IFN- γ), таким чином ініціюючи диференціацію Th1. Крім того, кілька факторів транскрипції, включаючи транскрипційний фактор T-box (T-bet), сигналізують перетворювач і активатор транскрипції-1 (STAT-1) і STAT-4. у повній диференціації клітин Th1. У кісткових риб численні ізоформи IL-12 та IFN- γ є ключовими цитокінами для диференціації Th1. Крім того, ген T-bet був охарактеризований у кісткових риб, таких як даніо, райдужна форель і білий амур, і T-bet вважається головним фактором транскрипції як для риб, так і для ссавців. Клітини Th1 викликають імунну відповідь на внутрішньоклітинні патогени шляхом вивільнення IFN- γ , який активує макрофаги та посилює їхню фагоцитарну активність. Клітини Th1 кісткових риб генерують одну або дві форми IFN- γ IFN- γ та IFN- γ rel. При інфекції *E. ictaluri* ми повідомили про підвищені рівні експресії гена IFN- γ , що корелює з підвищеною експресією генів CD4-1 і CD4-2 в лімфоїдних органах каналного сома. [40-42]

IL-2 та IL-4 є критично важливими цитокінами, відповідальними за диференціацію Th2 через регуляцію факторів транскрипції, що містять STAT-5, STAT-6 та GATA-3. Подібним чином два гени IL-2 та IL-4 були ідентифіковані у кісткових риб. На додаток до ключових цитокінів, головний фактор транскрипції GATA-3 був описаний у різних видів риб, включаючи рибок даніо, лососевих і білого амура. Клітини Th2 ефективні проти позаклітинних паразитів, індукуючи дегрануляцію клітин і тучних клітин, а також вироблення антитіл шляхом виробництва ключових цитокінів, включаючи IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13. Подібно до ссавців, пов'язані з Th2 імунні відповіді були виявлені в зябрах і шкірі риб з більшою експресією IL-4/13A і GATA-3 проти паразитів.

Клітини Th17, інша лінія Th-клітин, беруть участь у елімінації позаклітинних патогенів, включаючи бактерії та гриби. Основні цитокіни IL-6,

IL-21, IL-23 і трансформуючий фактор росту бета (TGF- β) керують диференціюванням клітин Th17 разом із регуляторами, включаючи гамма-рецептори-сироти, пов'язані з рецепторами ретиноївої кислоти (ROR γ) та альфа (ROR α) і перетворювача сигналу та активатора транскрипції 3 (STAT-3).

Основні елементи, необхідні для шлях-сегрегації клітин Th17 ссавців також виявлений у кісткових риб, що містить характерні цитокіни (IL-6, IL-21, IL-23 і TGF- β) і головний фактор транскрипції ROR γ . Клітини Th17 у ссавців продукують IL-17 (IL-17A, IL-17F), IL-21 та IL-22, які опосередковують запальні реакції, індукуючи залучення запальних клітин, таких як нейтрофіли, до місця інфекції та вироблення прозапальних цитокінів, таких як IL-1, IL-6 і TNF α . Кілька ізоформ генів IL-17A/F (IL-17A/F1, IL-17A/F2 та IL-17A/F3) були охарактеризовані у кісткових риб, таких як даніо, райдужна форель і фугу. Крім того, IL-17A/F2 стимулював антибактеріальний захист, індукуючи експресію антибактеріальних пептидів і прозапальних цитокінів, IL-6 та IL-8, у райдужної форелі. Крім того, Th17-подібна імунна відповідь була ідентифікована в тканинах слизової оболонки рибок даніо після інфікування живим ослабленим *Vibrio anguillarum*. [40-42]

Регуляторні Т-клітини (Treg) регулюють підтримку імунологічної толерантності до власних і чужорідних антигенів. Ключові цитокіни, TGF- β та IL-10, відіграють життєво важливу роль у диференціації клітин Treg через основний транскрипційний фактор, вилчасту коробку P3 (FoxP3). Подібно до ссавців, різні ізоформи генів типу TGF- β та IL-10 також присутні в рибах. На додаток до ключових цитокінів, головний регулятор FoxP3 був ідентифікований у кісткових риб. Tregs у ссавців виробляють ті самі ефекторні цитокіни, TGF- β та IL-10, які пригнічують прозапальні реакції після виведення патогенів, щоб запобігти пошкодженню тканин і підтримувати периферичну толерантність. IL-10, що виробляється Tregs, був ідентифікований у більшості видів кісткових риб, і його експресія була значно підвищеною через 2-5 тижнів після зараження. Крім

того, Tregs у кісткових риб зберігають периферичну толерантність шкіри райдужної форелі. [40-42]

У ссавців фолікулярні Т-клітини-хелпери (Tfh) регулюють проліферацію В-клітин і перемикає класів Ig, особливо в зародкових центрах лімфоїдних тканин. Основні цитокіни, IL-6 та IL-21, а також фактор транскрипції Bcl6 беруть участь у процесі диференціації клітин Tfh. Ефекторні клітини Tfh секретують IL-6, IL-21 і TGF- β для виконання своєї функції. На відміну від ссавців, кісткові риби не мають зародкових центрів і перемикає ізотипу Ig. Нещодавно клітини Th9 були визначені як підгрупа CD4⁺ Т-клітин, які сприяють імунній відповіді проти кишкових глистів та аутоімунних захворювань, включаючи розсіяний склероз (РС), запальне захворювання кишечника (ВЗК), ревматоїдний артрит (РА), системний червоний вовчак (СЧВ), псоріаз і рак, і вони демонструють потужні протипухлинні властивості. Цитокіни TGF- β та IL-4 і головний транскрипційний фактор STAT-6 відповідають за диференціацію клітин Th9. Важливий цитокін IL-9 секретується клітинами Th9. З іншого боку, дві субпопуляції CD4⁺ Т-клітин, клітини Tfh і Th9, ще не були виявлені у видів кісткових риб. Цитокіни TGF- β та IL-4 і головний транскрипційний фактор STAT-6 відповідають за диференціацію клітин Th9. Важливий цитокін IL-9 секретується клітинами Th9. З іншого боку, дві субпопуляції CD4⁺ Т-клітин, клітини Tfh і Th9, ще не були виявлені у видів кісткових риб. [40-42]

Ефекторні CD8⁺ цитотоксичні Т-клітини. CD8⁺ Т-клітини відіграють вирішальну роль в імунному захисті від внутрішньоклітинних патогенів, особливо вірусної інфекції. IL-12, що вивільняється з APC, є ключовим цитокіном, який керує диференціацією CD8⁺ Т-клітин ссавців через головні регулятори транскрипції, включаючи T-bet і еомезодермін (Eomes). Повідомлялося про гомологи субодиниць IL-12 у кісткових костистих. Подібним чином T-bet був охарактеризований у багатьох видів кісткових риб, і аналіз експресії генів показав, що T-bet запускає активацію CD8⁺ Т-клітин. Крім того,

Eomes був ідентифікований у кісткових риб, таких як даніо, атлантичний лосось і райдужна форель. Крім того, найвищий рівень експресії Eomes спостерігався в CD8⁺ Т-клітинах райдужної форелі. Молекула CD8 у ссавців представлена у двох формах: гомодимер з двох α ланцюгів або гетеродимер з α і β ланцюгів. Як α , так і β ланцюги молекули CD8 також були описані у більшості видів кісткових риб. Крім того, ми продемонстрували, що внутрішньоклітинний патоген, штами *E. ictaluri*, індукував активізацію експресії генів CD8 α і CD8 β в лімфоїдних тканинах каналного сома. [40-42]

CD8⁺ Т-клітини ссавців індукують апоптоз інфікованих клітин-господарів двома шляхами: секреторним і несекреторним механізмами. Секреторний шлях характеризується вивільненням гранульованих токсинів, включаючи перфорин і серинові протеази, відомі як гранзими, тоді як несекреторний шлях вимагає залучення рецепторів смерті клітин-мішеней, таких як Fas, розташованих на поверхні CD8⁺ Т-клітин. Секреторний шлях у кісткових риб подібний до такого у ссавців (рис. 5.4). Молекула, подібна до перфोरину, була ідентифікована в багатьох видах костистих. Клітини CD8 $\alpha\beta$ у карася гінбуна вбивають інфіковані вірусом клітини за допомогою перфोरину, а інгібітор перфोरину, конканаміцин А, пригнічує функцію знищення лімфоцитів CD8 $\alpha\beta$ у каналного сома та карася гінбуна. Ці дослідження показали, що перфорин індукує подібний шлях знищення кісткових риб (рис. 5.4). На додаток до перфोरину, гранзим зі структурою, подібною до структури ссавців, був ідентифікований у кісткових риб (рис. 5.4). Молекула гранзиму B-lime бере участь у цитотоксичності CD8⁺ Т-клітин у риб. Крім того, високо підвищені рівні мРНК гранзиму були виявлені в CD8⁺ Т-клітинах карася гінбуни при інфекції *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*). Серинова протеаза, подібна до гранзиму А, у карася гінбуна сприяла клітинному імунітету завдяки цитотоксичній активності. Крім того, несекреторний шлях був вивчений у кісткових риб. Наприклад, FasL-подібна молекула, ліганд апоптозу, була охарактеризована у кількох видів

костистих кісток, таких як каналний сом, теляпія та дорада. FasL-подібний білок у теляпії спричинив цитотоксичність для клітин Hela через апоптоз.

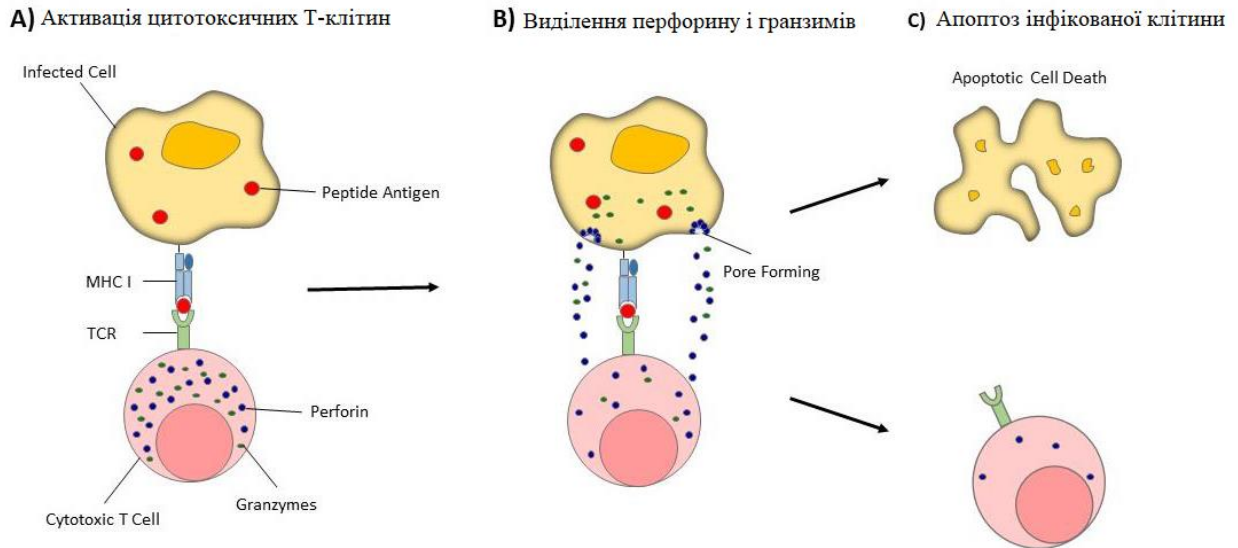


Рисунок 5.4 - Очищення інфікованих клітин-господарів ефektorними CD8⁺ T-клітинами (цитотоксичними T) у кісткових риб. Цитотоксичні T-клітини зв'язуються своїми TCR, які розпізнають пептид: комплекс MHC класу I на інфікованих клітинах-господарях (A). Цитотоксичні T-клітини виділяють перфоруин і гранзими, які індукують утворення пор і вивільнення цитотоксинів у цитоплазмі інфікованої клітини-хазяїна (B). Інфіковані клітини-господарі зазнають апоптотичної загибелі клітин, і цитотоксичні T-клітини відокремлюються від інфікованих клітин (C).

T-клітини CD8⁺ Teleost беруть участь у клітинно-опосередкованій цитотоксичності, яка контролює внутрішньоклітинні патогени. Популяція клітин CD8⁺ вбивала інфіковані вірусом клітини-мішені в рибі. Підвищена цитотоксична активність CD8⁺ T-клітин із підвищеною кількістю CD8⁺ клітин сприяє елімінації інфікованих *E. tarda* клітин і бактерій у

селезінці та нирках риб. Крім того, адаптивний перенос лімфоцитів CD8 від риби, інфікованої вірусом гемопоетичного некрозу коропа, до наївних реципієнтів забезпечив ефективний захист карася гінбуна під час останнього зараження вірусом. [40-42]

5.4 Гуморально-опосередковані реакції в адаптивному імунітеті риб.

В-клітини опосередковують гілку гуморального імунітету адаптивної імунної системи шляхом секреції антитіл. Антитіла поділяються на дві групи: секретована розчинна форма, імуноглобуліни (Igs) або антитіла, або В-клітинні рецептори (BCR), мембранозв'язана форма. Ig у ссавців складаються з двох важких ланцюгів (IgH) і двох легких ланцюгів (IgL), які з'єднані дисульфідними зв'язками, що призводить до утворення молекули у формі «Y». І ланцюги IgH, і IgL складаються з однієї варіабельної області, що називається Fab-областю (фрагмент, антиген-зв'язувальний), який надає антитілу специфічність для зв'язування антигену, і одного або кількох константних доменів, які називаються Fc-областю (фрагмент, що кристалізується), які визначають ефекторні функції антитіла. Антитіла індукують нейтралізацію, інтерналізацію та елімінацію патогенів, а також антитілозалежну клітинну цитотоксичність (ADCC) через ефекторні клітини, що несуть Fc-рецептор. Антитіла також активують каскад комплементу, який опосередковує інтерналізацію патогенів, покритих комплементом, фагоцитуючими клітинами та лізис патогенів шляхом утворення комплексу атакуючої мембрани. Структура та функція Ig у кісткових риб подібні до таких у ссавців. Три класи IgM були виявлені у кісткових риб: IgM, IgD та IgZ/T (табл. 5.2). [40-43]

BCR у ссавців складається з мембранозв'язаного антитіла, пов'язаного з гетеродимером Ig- α /Ig- β , відомим як CD79a/b, який є вирішальним для передачі сигналу через наявність домену ITAM. Подібно до TCR, антигенна

специфічність BCR та Ig формується шляхом перебудови гена V(D)J, опосередкованої генами RAG. Подібно до вищих хребетних, ген IgH у кісткових риб організований за конфігурацією кількох сегментів гена V(D)J, за якими слідують постійні (C) сегменти (V-D-J-C). Однак ланцюг IgL організований у вигляді повторюваного набору сегментів V-J-C.

Таблиця 5.2 - Загальна структура ізотипів Ig у кісткових риб

Ізотипи Ig	Костисті риби	Ссавці
IgM	Тетрамер Без ланцюга J Дисульфідні зв'язки- асоційовані Сироватка Слизова за відсутності IgT/Z	Пентамер J пов'язаний з ланцюгом Сироватка
IgD	Трансмембранний Секретний: немає домену V Домен C від 2 до 16	Мономер
IgT/Z	Унікальний для кісткових риб слизова Тетрамер у слизовій тканині Мономер в сироватці	Не присутній

У ссавців кістковий мозок є основним місцем кровотворення, яке продукує В-клітини. Однак у кісткових риб відсутній кістковий мозок, і В-клітини розвиваються в передній нирці, головному місці кровотворення у кісткових кісток. Зрілі В-клітини ссавців знаходяться у вторинних лімфоїдних тканинах, таких як селезінка та лімфатичні вузли. Хоча лімфатичні вузли відсутні у кісткових риб, зрілі В-клітини знаходяться в селезінці та задній нирці кісткових риб. Крім того, В-клітини знаходяться в різних тканинах, таких як власна пластинка кишечника та в епітелії шкіри та зябер. Після розпізнавання антигену

В-клітини диференціюються в короткоживучі плазматичні клітини (SLPC), що утворюються в позафолікулярних ділянках вторинних лімфоїдних тканин, з тривалістю життя 3-5 днів, або довгоживучі плазматичні клітини (LLPC), що утворюються в зародкові центри вторинних лімфоїдних органів із тривалістю життя від кількох місяців до життя. Подібний патерн диференціації В-клітин до плазматичних клітин був описаний у кісткових риб. Плазматичні клітини костистих риб поділяються на SLPC, що утворюються в селезінці, і LLPC, розташовані лише в передній нирці риби. [42]

Зародковий центр (GC) — це мікрооточення, де відбувається соматична гіпермутація та реакція рекомбінації перемикування класів для диверсифікації антитіл і дозрівання афінності.

Індукована активацією цитидиндезаміназа (AID) опосередковує соматичну гіпермутацію для підвищення афінності антитіл і опосередковує рекомбінацію перемикування класів для генерації антитіл зі спеціалізованими ефекторними функціями. Отже, довгоживучі плазматичні клітини виробляють високоафінні антитіла з перемикуванням класів, тоді як короткоживучі клітини експресують низькоафінні IgM антитіла. У той час як кісткові риби не мають ГК в імунних тканинах, мелано-макрофагальні центри утворюються численними макрофагами в лімфоїдних тканинах, таких як селезінка, і мають подібну функцію до ГК. Крім того, фермент AID костистих риб, який опосередковує соматичну гіпермутацію та каталізує рекомбінацію перемикування класів у В-клітинах ссавців *in vitro*, вперше був ідентифікований у каналного сома. Незважаючи на наявність AID у костистих риб, у них все ще не вистачає рекомбінації перемикування класів через структуру гена IgH, що призводить до низької ефективності реакції дозрівання афінності порівняно зі ссавцями. [42]

Подібно до Т-клітин, В-клітини диференціюються в В-клітини пам'яті в ГК лімфоїдних тканин після активації антигенною взаємодією. Крім того, кісткові риби розвинули імунологічну пам'ять, яка забезпечує швидка та

ефективна відповідь на патоген, який зустрічався раніше. Наприклад, утворення В-клітин пам'яті у райдужної форелі призвело до швидшої та більшої величини вторинної відповіді на гемоціанін тринітрофенільованого лімпета. Крім того, антитіла афінність була вищою у лососевих під час вторинної відповіді на той самий антиген через В-клітини пам'яті. Крім того, вакцинація ослабленим рабдовирусом вірусної геморагічної септицемії (VHSV) індукувала генерацію В-клітин пам'яті, які підвищували титри сироватковий IgM у райдужної форелі у відповідь на той самий антиген. Таким чином, вакцинація є профілактичним методом захисту кісткових риб від економічно руйнівних патогенів протягом кількох років після імунізації завдяки імунологічній пам'яті. [43]

На додаток до вирішальної ролі В-клітин в адаптивному імунитеті, дві підгрупи В-клітин ссавців, клітини В-1 і В-клітини маргінальної зони (МЗ) беруть участь у вродженому імунитеті, включаючи виробництво цитокінів, фагоцитарну здатність, презентацію антигену та внутрішньоклітинний імунитет. Подібно до В-клітин В-1 і МЗ ссавців, В-клітини костистих риб здатні до фагоцитозу та знищення бактерій, які проковтнули. Фагоцитарна здатність В-клітин була описана у райдужної форелі, і у цих риб спостерігалось утворення фаголізосом. Крім того, В-клітини рибок данію показали сильну фагоцитарну здатність до частинок і розчинних антигенів і могли презентувати антигени Т-клітинам, як В-клітинам ссавців. Крім того, фагоцитарна ємність В-клітин, виділених із передньої нирки та периферичної крові, була вищою, ніж нейтрофілів у атлантичної тріски. Раніше повідомлялося, що велика кількість В-клітин у крові сома була фагоцитною. Нещодавно наша дослідницька група продемонструвала як активне поглинання штамів *E. ictaluri* В-клітинами передньої нирки сома при 30°C та 4°C, так і утворення фагосом та/або фаголізосом у цитоплазмі В-клітин. Крім того, інтерналізовані штами *E. ictaluri* були знищені В-клітинами сома при 30°C, але не при 4°C. [43]

Імуноглобулін М. IgM відомий як найдавніший клас антитіл, виявлених у всіх щелепних хребетних з унікальними особливостями. У ссавців секретований IgM присутній у вигляді пентамерної форми, пов'язаної з приєднувальним (J) ланцюгом. Імуноглобулін М, вперше ідентифікований у плазмі та найбільш поширений у кісткових риб, описаний у двох різних формах: секретована та трансмембранна форма. Секретована форма IgM мультимеризується в тетрамерну форму, полімеризовану міжланцюговими дисульфідними зв'язками через відсутність J-ланцюга (табл. 5.2). Однак деякі види кісткових риб, наприклад райдужна форель, мають мономерний IgM у сироватці крові. У райдужної форелі спорідненість зв'язування як мономерного, так і тетрамерного IgM подібна, але тетрамерна форма IgM більш ефективна для активації системи комплементу. Крім того, трансмембранна форма IgM у В-клітинах на один домен коротша за секретовану форму через альтернативний сплайсинг. Крім того, IgM, єдиний ізотип у кісткових риб, має два підтипи, ідентифіковані в атлантичного лосося та кумжі. Подібно до ссавців, IgM кісткової кістки сприяє як вродженій, так і адаптивній імунній відповіді, включаючи активацію комплементу, індуковану опсонізацію, лізис патогенів і опосередкування клітинної цитотоксичності через ADCC. Крім того, IgM регулює аглютинацію для фагоцитозу, що призводить до очищення патогенів. Окрім плазми, IgM було виявлено в тканинах слизової оболонки, таких як шкіра та кишечник риб. Імунізація індукує підвищений титр IgM у сироватці риби, але призводить до слабкого покращення афінного дозрівання порівняно зі ссавцями. Нещодавно наша дослідницька група виявила значно підвищені рівні IgM у сироватці каналного сома після вакцинації штамами *E. ictaluri*. [43]

Імуноглобулін D. Імуноглобулін D – це другий клас Ig, ідентифікований у риб, який має схожість послідовності з IgD у ссавців. Однак кісткові риби мають унікальні властивості IgD завдяки багатьом формам (від 2 до 16) константних доменів IgD (табл. 5.2). Крім того, єдина трансмембранна форма IgD була

виявлена у кісткових риб, за винятком каналного сома, японського фугу та райдужної форелі, які мають дві форми: трансмембранну та секреторну. Секретований IgD (у якого відсутній домен V) зв'язується безпосередньо з Fc-рецептором базофілів, функціонуючим як рецептор розпізнавання образів. Таким чином, він може індукувати запальні реакції, включаючи вироблення прозапальних цитокінів, антимікробних, опсонізуючих і В-клітинних активуючих факторів. Імуноглобулін D у кісткових риб в основному міститься в сироватці крові, а також експресується в передній і задній нирках, селезінці та зябрах. Крім того, рівень IgD був вищим у зябрах райдужної форелі порівняно з рівнем IgM. [43]

Імуноглобулін T/Z. IgT/Z, єдиний Ig, специфічний для кісткових риб, був вперше ідентифікований у райдужної форелі (IgT) і рибок даніо (IgZ) (табл. 5.2). IgT/Z функціонує подібно до IgA ссавців. Рівень IgT/Z у кишківнику райдужної форелі був набагато вищим (у 63 рази), ніж у сироватці крові, тоді як концентрація IgM у сироватці була набагато вищою порівняно з IgT/Z. IgT/Z у кишечнику кісткових риб сприяє імунній відповіді проти кишкових паразитів і бактерій. Наприклад, кількість IgT⁺ В-клітин зросла в кишечнику райдужної форелі після паразитарної кишкової інфекції, хоча кількість IgM⁺ В-клітин не змінилася в тій же тканині. На додаток до IgT⁺ В-клітин, концентрація IgT була підвищена в кишечнику вижилої райдужної форелі. Однак титр паразитоспецифічних IgM був вищим у сироватках тварин, що вижили. Крім того, IgT⁺ В-клітини в кісткових рибах були виявлені в лімфоїдній тканині, пов'язаній зі шкірою, і секретували IgT у шкірний слиз. IgT присутній у сироватці крові риб як мономер, але має тетрамерну форму в кишковому слизу. Деякі види костистих риб, такі як каналний сом, не мають IgT; отже, IgM є основним класом Ig як у сироватці, так і в імунітеті слизової оболонки.

ВИСНОВКИ

Останні відкриття в імунології риб показують, що було досягнуто значного прогресу в механістичному розумінні імунних реакцій риб. Дві гілки імунної системи риб, вроджений і адаптивний імунітет, надають важливу інформацію для розуміння еволюції імунної системи.

Дослідження риби з новими реагентами та потужними процедурами секвенування та нокауту забезпечать цінну основу для оцінки дуже складних адаптивних імунних реакцій. Крім того, вартість інфікування риби для аквакультури може бути величезною, що робить збій імунітету головним ризиком для комерційного рибництва.

Наявність адаптивної імунної системи та, як наслідок, імунної пам'яті у кісткових риб дозволяє вакцинацію, найбільш прийнятний метод боротьби з хворобами в аквакультурі. На додаток до вакцинації, були розроблені різні підходи до боротьби з інфекційними захворюваннями в аквакультурі, такі як високоякісні дієти, включаючи пробіотики, пребіотики та лікарські рослини та лікування антибіотиками. Крім того, запобіжні заходи біозахисту на рівні ферми, включаючи дезінфекцію яєць, обробку води, чисту їжу, контроль руху, інтенсивні карантинні заходи, видалення та утилізацію відмерлих тварин, є профілактичними підходами до забезпечення безпеки підприємства перед спалахом будь-яких захворювань.

Показники крові об'єктивно відображають інтенсивність обмінних процесів, що протікають в організмі риб та мають високі корелятивні зв'язки з віком, сезоном, живленням та іншими факторами, що впливають на нормальне зростання та розвиток. Їх діагностична цінність визначається варіабільністю, яка вказує як на фізіологічну різноякісність риби, що вирощується, так і на можливість індивідуальної реакції. Для оперативного контролю інформативними

– є показники вмісту гемоглобіну, числа еритроцитів, лейкоцитів та активності еритропоезу. Середнє значення будь-якого показника для гематологічної норми лежить у межах коливання довірчих меж варіабільності середньої.

Кров реагує на впливи різних антропогенних та біогенних факторів проявом низки адаптивних реакцій, що протікають на організмовому рівні, у розвитку кількісного принципу. Зміна межі нормальних значень гематологічних показників під впливом факторів, пов'язаних із технологією вирощування. Він для багатьох параметрів крові технологічної норми, оскільки, задовольняючи потреби організму, забезпечує його оптимальний приріст.

Стрес-фактори викликають різкі зміни гематологічних показників культивованих риб, які виявляються у зниженні числа тромбоцитів, величини лейкоцитів та числа лейкоцитів. Виникаюча у риб лейкопенія характеризується еозино- та лімфопенією та нейтрофілозом, що характерно і для інших груп хребетних при стресі.

Зміни у картині крові залежать від ступеня патогенності збудника та рівня інвазії. При низьких рівнях зараження риб паразитами формуються адаптивні реакції крові, які збільшення рівня зараження не переходять у патологічні. При подальшому зростанні чисельності збудників, як правило, формується стрес-реакція на тлі якої часто відзначаються патологічні зрушення, характерні для гострого перебігу захворювань.

Наявність стресових ситуацій та недотримання технологій сприяє виникненню незаразних хвороб риб. Недостатньо повноцінна годівля риби взимку в тепловодних садових та басейнових господарствах призводить до порушення процесів метаболізму та виникнення синдрому дефіциту енергії. Зміни протікають на субклітинному рівні та супроводжуються зниженням загального білка та зміною іонного складу в сироватці крові, збільшенням кількості вологи в тілі, зниженням вмісту жиру та білка в ньому. Годівля риби неякісними чи неповноцінними кормами призводить до виникнення у неї

аліментарних захворювань. Використання гематологічних показників для їхньої діагностики пов'язане з виявленням анемії. Профілактика цих захворювань зводиться до своєчасного виявлення таких кормів та усунення їх із раціону.

Отримані результати досліджень лягають в основу рекомендацій щодо корекції адаптивних можливостей організму риб під час вирощування, оцінки стресових впливів та патогенності збудників, розробки способів діагностики інвазійних та незаразних захворювань та методів їх профілактики. Отримані дані розширюють відомості порівняльної гематології, загальної патології та клітинної імунної відповіді хребетних тварин.

Комплексний підхід до системи крові риб як еволюційного етапу загальної гематології дозволив дати загальну морфологічну характеристику клітинних елементів про появу в кров'яному руслі бластів, патологічних клітинних форм, функції тромбоцитів та ін. використання іхтіогематологічних досліджень і ряд основних постулатів:

1. іхтіогематологія відбиває загальну картину різноманіття шляхів розвитку системи крові тваринного світу;
2. відеоспецифічність картини крові відбивається як у кількісних показниках (вікових та сезонних коливаннях її окремих показників), так і в ряді морфологічних особливостей лейкоцитарного складу;
3. у формуванні адаптивних реакцій системи крові визначальне значення надають екологічні фактори, що виступають як стресори;
4. специфічні зміни у картині крові можливо виявити лише під впливом специфічного антигену (наприклад, кровопаразитів), проте інші зміни вписуються в закономірності протікання загального адаптивного синдрому чи стресу.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРНИХ ПОСИЛАНЬ

1. Іванов А.А. Фізіологія риби/А.А. Іванов. М: Світ, 2003. 284 с.
2. Ахтар М.С. Термічна толерантність, споживання кисню та гемато-біохімічні показники молоді *Tor putitora*, акліматизованої до п'яти температур / М.С. Ахтар, А.К. Пал, Н.П. Саху, А. Чиджі, П.С. Маханта // Риби. Фізіол. Біохім. 2013. Том. 39, ні. 6. С. 1387-1398.
3. Бейтінгер Т.Л. Температурна стійкість прісноводних риб Північної Америки, що зазнають динамічних змін температури / Т.Л. Бейтінгер, В.А. Беннет, Р.В. МакКолі // Навколишнє середовище. Біол. Риба. 2000. Том. 58, ні. 3. С. 237-275.
4. Голованов В.К. Температурні критерії життєдіяльності прісноводних риб/В.К. Голованів. М: Поліграф-Плюс, 2013. 300 с.
5. Голованов В.К. Еколого-фізіологічні закономірності розподілу та поведінки прісноводних риб у термоградієнтних умовах / В.К. Голованов // Зап. іхтіології. 2013. Т. 53 № 3. С. 286-314.
6. Капшай, Д.С. Верхня летальна температура молодих теплолюбних видів риби залежно від температури акліматизації / Д.С. Капшай, В.К. Голованов // Сер.: Експериментальна біологія. 2013. № 3. С. 185-189.
7. Аніта Б. Оцінка генотоксичності теплового шоку у золотих рибок (*Carassius auratus*) / Б. Аніта, Н. Чандра, П. М. Гопінатх, Г. Дурарайдж // Мутат. різ. Дружині. Токсикол. та Енвайрон. Мутаген. 2000. Том. 469 № 1. С. 1-8.
8. Мікряков В.Р. Реакція імунної системи риби на забруднення води токсикантами та закислення середовища / В.Р. Мікряков, Л.В. Балабанова, Є.А. Заботкіна, Латерова Т.Б., Попов А.В.: Наука, 2001. 126 с.
9. Головіна Н.А., Романова Н.М. Лабораторний практикум з фізіології риб: Навчальний посібник. - СПб.: Видавництво "Лань", 2019. - 136 с.

10. Іванова Н.Т. Деякі аспекти до основ їхтіогематології/Н.Т. Іванова. - Ростов н / Д: з-під РГПУ, 2002. - 54 с.
11. Riera Romo, M.; Pérez-Martínez, D.; Castillo Ferrer, C. Innate immunity in vertebrates: An overview. *Immunology* 2016, 148, 125–139.
12. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Innate immunity. In *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed.; Garland Science: New York, NY, USA, 2002.
13. Smith, N.C.; Rise, M.L.; Christian, S.L. A comparison of the innate and adaptive immune systems in cartilaginous fish, ray-finned fish, and lobe-finned fish. *Front. Immunol.* 2019, 10, 2292.
14. Sahoo, S.; Banu, H.; Prakash, A.; Tripathi, G. Immune system of fish: An evolutionary perspective. In *Antimicrobial Immune Response*; del Mar Ortega-Villaizan, M., Chico, V., Eds.; IntechOpen: London, UK, 2021; p. 1. Available online: <https://www.intechopen.com/chapters/78026> (accessed on 17 December 2022).
15. Біорізноманіття та роль тварин в екосистемах: Матеріали V Міжнародної наукової конференції. – Дніпропетровськ: Ліра, 2009. – С. 103-105.
16. Біорізноманіття та роль тварин в екосистемах: Матеріали IV Міжнародної наукової конференції. – Дніпропетровськ: Вид-во ДНУ, 2007. – С. 148-149.
17. Agius, C., & Roberts, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26(9), 499-509. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>
18. Ahuja, S. S., Estrada, C. A., & Lindsey, M. L. (2007). Crosstalk Between Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen-4 and Interleukin-12 in Cytotoxic T-Lymphocyte-; Mediated Myocarditis. *Circulation Research*, 101(3), 218-220. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.158238>

19. Akkaya, M., Kwak, K., & Pierce, S. K. (2020). B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 20(4), 229-238. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0244-2>
20. Andersen, M. H., Schrama, D., thor Straten, P., & Becker, J. C. (2006). Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(1), 32-41. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700001>
21. Annunziato, F., & Romagnani, S. (2009). Heterogeneity of human effector CD4(+) T cells. *Arthritis Research & Therapy*, 11(6), 257-257. <https://doi.org/10.1186/ar2843>
22. Arkoosh, M. R., & Kaattari, S. L. (1991). Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I. An immunochemical and cellular analysis of the B cell response. *Developmental and comparative immunology*, 15(4), 279-293.
23. Поморцева Н. А., Гудков Д. І. Гематологічні показники окуня звичайного та карася сріблястого в умовах водойм Чорнобильської зони відчуження. Збірник 207 тез науково-практ. конф. Чорнобильська катастрофа. Актуальні проблеми, напрямки та шляхи їх вирішення. (24–26 квітня 2018 р., м. Житомир). Житомир, 2018. С. 23–28.
24. Поморцева Н. А., Гудков Д. І., Родіонова Н. К., Каглян А. Є. Зміни лейкоцитарної формули та цитоморфологічних показників еритроцитів периферичної крові риб у Чорнобильській зоні відчуження Тези доповідей 20-ї Щорічної наук. конф. Ін-ту ядерних досліджень НАН України. (28 січня – 01 лютого 2013 р., м. Київ). Київ, 2013. С. 152-153.
25. . Каглян О. Є., Гудков Д. І., Кленус В. Г., Широка З. О., Поморцева Н. А., Ткаченко В. О., Шевцова Н. Л., Назаров О. Б., Яблонська Л. І., Юрчук Л. П. Дозові навантаження внутрішнього опромінення риб водойм Чорнобильської зони відчуження. IV Міжнарод. наук. конф. Фізичні методи в екології, біології та медицині. (15–18 вересня 2011 р., г. Шацьк). Львів, 2011. С.137–141.

26. Гудков Д. І., Шевцова Н. Л., Дзюбенко Є. В., Поморцева Н. А., Назаров А. Б. Радіобіологічні наслідки хронічного опромінення водної біоти Чорнобильська зона відчуження. Тези доповідей на міжнародній конференції.

27. Радіобіологічні та радіоекологічні аспекти Чорнобильської катастрофи. (11-15 квітня 2011 р., м. Славутич). Славутич, 2011. С. 72. (Польові дослідження, обробка та аналіз даних, участь у написанні тези).

28. Поморцева Н. А., Родіонова Н. К., Гудков Д. І., Савчук Н. В., Несторяк Д. М. Гематологічні показники периферичної крові у риб водоймах Чорнобильської зони відчуження. Тези доповідей міжнародної конференції. Радіобіологічні та радіоекологічні аспекти Чорнобильської катастрофи. (11-15 квітня 2011 р., м. Славутич). Славутич, 2011. С. 204.

29. Buzevych, I. Yu., (2012). Stan ta perspektyvy rybohospodarskoho vykorystannia promyslovoi ikhtiofauny velykykh rivnynnykh vodoskhovyshch Ukrainy [Status and prospects of the fishery use of the industrial ichthyofauna of large plain reservoirs of Ukraine]. Dys. ... doktora biol. nauk: 03.00.10. Kyiv, 297 (in Ukrainian).

30. Heina, K. N. (2019). Stan ta dynamika popovnennia promyslovoho zapasu ikhtiofauny ponyzziv r. Dnipro [Status and dynamics of replenishment of the industrial stock of ichthyofauna in the lower reaches of the Dnipro River]. Rybohospodarska nauka Ukrainy, 1(47), 17–27. doi: 10.15407/fsu2019.01.017 (in Ukrainian).

31. Skyba, O. I., Hrubinko, V. V. & Fedoniuk, L. Ya. (2018). Zapobihannia zabrudnenniu hidroekosystem vazhkymy metalamy yak odna z form realizatsii tsilei staloho rozvytku v Ukraini [Prevention of pollution of the hydroecosystems with heavy metals as one of the forms of realization of the goals of sustainable development in Ukraine]. Ekolohichni nauky, 4 (23), 101–105. doi: 10.32846/2306-9716-2018-4-23-22 (in Ukrainian).

32. Snitynskyi, V .V. & Onyskovets, M. Ya. (2011). Osnovni mekhanizmy toksychnoi dii yoniv vazhkykh metaliv na orhanizm ryb [The main mechanisms of toxic

action of heavy metal ions on the fish]. *Naukovyi visnyk LNUVMBT imeni S.Z. Gzhytskoho*, 13, 2(48), 471–476 (in Ukrainian).

33. Рижко І. Л. Відмінності деяких морфологічних параметрів крові бичка Пінчука *Ponticola cephalargoides* (Pinchuk, 1976) та бичка ратана *Ponticola ratan* (Nordmann, 1840) в Одеській затоці / І. Л. Рижко, Ю. В. Караванський // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. Спеціальний випуск: Гідроекологія. – 2015. – № 3-4 (64). – С. 568 – 572.

34. Методичні вказівки до великого спецпрактикуму з фізіології людини та тварин / Сьомік Л. І., Гладкій Т. В., Коломійчук Т. В., Карпов Л. М. – Ч. 1.– Одеса, 2005. – С. 5 – 12.

35. Ashfaq, H., Soliman, H., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2019). CD4: a vital player in the teleost fish immune system. *Veterinary Research*, 50(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0620-0>

36. Bajoghli, B., Dick, A. M., Claasen, A., Doll, L., & Aghaallaei, N. (2019). Zebrafish and Medaka: Two Teleost Models of T-Cell and Thymic Development. *Int J Mol Sci*, 20(17), 4179. <https://doi.org/10.3390/ijms20174179>

37. Атраментова Л. О. Статистичні методи в біології // Л. О. Атраментова, О. М. Утєвська. – Х. : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2007. – 288 с.

38. Бегляров Я. О. Морфологічна характеристика еритроцитів трьох видів бичкових риб роду *Ponticola* / Я. О. Бегляров // дипломна робота на 40 здобуття ступеня вищої освіти «магістр». – Одеса: ОНУ імені І. І. Мечникова. – 2019. – 52 с.

39. Arshanytsya N. M. Ryby yak indykatory zabrudnennya donnykh vidkladen rybohospodars'kykh vodoym / N. M. Arshanytsya, V. YU. Hulyukin //Nauch.-tekhn. symposium «Suchasni zasoby vidtvorennya ta vykorystannya vodnykh bioresursiv»: Tez. dop. - SPb, 2000. - Т. 4. - S. 46 - 48.

40. Alenychev S. V. Tsytomorfolohichnyy sklad krovi ta dynamika hematolohichnykh pokaznykiv okunya Perca Fluviatilis L. Onez'koho озера v umovakh tekhnohennoho zabrudnennya / S. V. Alenichev, L. P. Ryzhkov // Pytannya ikhtiologii, 2000. - №1. - S. 86 - 91.
41. Компанець Е. В. Активність лімфоцитів у крові імунізованих в черевну порожнину коропів в системі «паразит-господар» / Е. В. Компанець // Рибогосподарська наука України. – 2013. – № 2. – С. 76–82.
42. Омельковець Я. А. Морфологічне дослідження лейкоцитів та тромбоцитів промислових видів риб Волинської області / Я. А. Омельковець, К. А. Сологор, В.-В. В. Ціхоцька // Наука і освіта 2005 : матеріали VIII міжнар. наук.-практ. конф. – Дніпропетровськ, 2005. – С. 46–47.
43. Омельковець Я. А. Порівняльно-морфологічне дослідження формених елементів крові промислових видів риб Волинської області / Я. А. Омельковець, К. А. Сологор, В.-В. В. Ціхоцька // Природа західного Полісся та прилеглих територій : зб. наук. пр. – Луцьк : РВВ «Вежа» ВДУ ім. Лесі Українки, 2004. – 163–167.