

УДК 619:597.554.3:612.017

Оценка возможности применения медицинских препаратов, стимулирующих метаболические процессы, для коррекции стрессовых нагрузок и ускорения регенерации тканей рыб

К.В.Гаврилин¹, Т.А.Суворова², А.К.Пономарев¹

¹ Институт Биотехнологий и рыбного хозяйства (ФГБОУ ВО «МГУТУ (ПКУ) », г. Москва)

² Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН (ФГБУН «ИБВВ РАН», п. Борок, Ярославская область)

E-mail: k.gavrilin@yandex.ru

Охрана здоровья культивируемых в аквакультуре гидробионтов сталкивается с проблемой коррекции иммунодефицитных состояний различного генеза. С иммуносупрессией связано развитие оппортунистических инфекций. Помимо этого, иммуно-физиологический статус выращиваемых рыб напрямую связан с рыбоводными и, как следствие, экономическими показателями предприятий аквакультуры. В связи с чем актуальным представляется поиск «инструментов» для коррекции иммунного статуса рыб. Темой нашего исследования являлась оценка возможности использования широко применяемых в гуманной медицине веществ, положительно влияющих на метаболические процессы — ксимедона и метилурацила, в качестве иммуностимуляторов для рыб. В серии экспериментов, выполненных на основном объекте отечественной аквакультуры — карпе (*Cyprinus carpio*), проведена оценка их влияния на лабораторные показатели, характеризующие напряженность антиинфекционного иммунитета рыб (бактерицидная активность сыворотки крови) и регенерацию тканей после механических повреждений. В результате проведенных исследований установлено, что оба вещества оказывают положительное влияние на гуморальное звено иммунитета карпа и стимулируют регенерацию тканей.

Ключевые слова: стресс, иммунитет, ксимедон, метилурацил, бактерицидная активность сыворотки крови, регенерация тканей.

ВВЕДЕНИЕ

При рассмотрении эпизоотической ситуации в отечественном рыбоводстве, не возможно не обратить внимания на то, что значительная часть патологий тем или иным образом связана с иммунодефицитными состояниями различного генеза. Например, наиболее распространённое инфекционное заболевание рыб — бактериальная геморрагическая септицемия (аэромоназ), практически всегда возникает на фоне снижения их иммуно-физио-

логического статуса. Аналогичную ситуацию можно наблюдать и при некоторых паразитарных инвазиях. Например, было установлено, что при поражении карпов *Cyprinus carpio*, (L. 1758) паразитической инфузориёй *Ichthyophthirius multifiliis*, погибают особи с наименьшими показателями индекса завершённого фагоцитоза [Гаврилин, 2012]. Причиной иммуносупрессии, в большинстве случаев, является влияние на рыб стрессирующих факторов. При любых неблагоприятных воздей-

ствиях происходит мобилизация «ресурсов» организма, необходимых для их преодоления. При длительном и (или) сильном воздействии, за стадией «мобилизации» наступает стадия «истощения». Происходят изменения иммунологических и физиологических лабораторных показателей. Можно наблюдать изменение картины крови (уменьшение количества лимфоцитов и тромбоцитов), снижение бактерицидной активности сыворотки крови, нарушение барьерных функций эпителия [Головин, 1984; Грищенко, Рудиков, 1985].

В связи с этим, весьма привлекательным направлением развития неспецифической иммунотерапии (иммунопрофилактики) болезней рыб выглядит использование широко применяемых в гуманной медицине иммуностимуляторов. Принципиальная возможность увеличивать напряжённость иммунитета рыб при помощи определённых химических соединений показана зарубежными исследователями на примере форели *Oncorhynchus mykiss* [Wahli et al., 1995]. Введение в рацион поражённым ихтиофтириозом *Ichthyophthirius* sp. рыбам различных препаративных форм аскорбиновой кислоты, задерживало развитие болезни и снижало уровень гибели животных.

При проведении скрининга субстанций действующих веществ наше внимание привлекли два соединения из группы пиримидинов — ксимедон (гидроксиэтилдиметилдигидропиримидин) и метилурацил (диоксометилтетрагидропиримидин). Фармакологическое действие пиримидинов, как уже было отмечено выше, наиболее полно изучено в гуманной медицине. Препараты на их основе улучшают местное кровообращение, оказывают регенерирующее и ранозаживляющее действия, ускоряют процессы регенерации тканей и сокращают сроки заживления ожоговой поверхности, улучшают приживление кожных трансплантатов при аутодермопластике. Нормализуют соотношение между содержанием фибриногена и фибринолитической активностью крови, улучшают регионарное кровообращение. Повышают иммунный статус, фагоцитарную активность Т-лимфоцитов и неспецифическую резистентность организма.

Их активность обусловлена тем, что они действуют как синтетический аналог эндоген-

ных регуляторных пептидов. Пиримидины активируют аденилатциклазу, что приводит к быстрому накоплению циклического аденозинмонофосфата в клетке, это стимулирует обменные процессы, в первую очередь, биосинтеза белка. Препарат воздействует на систему регуляции активного транспорта кальция в клетке, влияет на процессы тканевого дыхания, перекисного окисления липидов и активность антиоксидантной системы. Он также влияет на сульфгидрильный статус иммунокомпетентных клеток, проявляет антимутагенную и антимикробную активность [Слабнов и др., 1997, 1998; Котов и др., 2002].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Экспериментальная часть исследования была выполнена в два этапа. На первом мы постарались оценить влияние пиримидинов на бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК). На втором этапе был проведён опыт по исследованию влияния метилурацила и ксимедона на регенерационные процессы.

Для постановки опытов первого этапа мы использовали клинически здоровых карпов, среднештучной массой 150 ± 10 г. Их содержали в ёмкостях, где была обеспечена аэрация и фильтрация воды при температуре 21°C . Условия содержания соответствовали видовым биологическим потребностям. На базе полноценного экструдированного корма для декоративных прудовых рыб Tetra Pond (Tetra GmbH, Германия) были изготовлены корма с ксимедоном и метилурацилом. Концентрация субстанций в корме обеспечивала возможность введения этих препаратов рыбам в дозе 40 мг/кг в сутки, методом вольного группового скармливания. Длительность кормления составляла 10 сут. Контрольная группа карпов находилась в тех же условиях и получала тот же корм, но без каких либо добавок. Поедаемость кормов при всех экспериментах составляла 100% в течение нескольких минут. Таким образом, перерасчёта фактически полученной рыбами дозы препаратов не требовалось.

До начала кормления (карпы отобраны случайным образом до формирования контрольной и опытных групп), через сутки и спустя 7 дней после окончания скармливания препаратов, проводили иммунологические исследова-

ния (0, 11 и 17 сут. соответственно). Изучали бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК), которая является интегрированным выражением противомикробных свойств гуморального звена неспецифического иммунитета: лизоцима, комплемента, пропердина, протеаз, С-реактивного белка, агглютининов, преципитинов и т. д. [Лукьяненко, 1989; Микряков и др., 1991]. БАСК определяли с помощью фотонейлометрического колориметрирования, согласно методике, описанной О.В.Смирновой и Т.А.Кузьминой [1966] и адаптированной для рыб [Микряков и др., 1991].

Для исследования влияния препаратов на регенерацию тканей (второй этап) 40 экз. клинически здоровых карпов, среднештучной массой 120 ± 20 г искусственно нанесли одинаковые травмы: соскабливание мягких тканей с головы на площади 1 см^2 , царапина на теле с обнажением мышечного слоя длиной 5 см, разрушение нижней лопасти хвостового плавника (рваная скоблёная рана). Рыб разделили на 3 группы (по 10 экз.) и рассадил в разные ёмкости. Рыбы получали те же корма, так же в течение 10 сут.

Учёт результатов вели на основании следующих признаков: поверхность эпителизации раны на голове, длина видимого шрама на боковой поверхности, процент площади восстановления лучей хвостового плавника. Для определения процента восстановления хвостового плавника использовали специальные лекала, на которые до разрушения плавника наносили его контур.

Результаты исследований подвергали статистической обработке при помощи стандартного пакета программ (приложение Statistica и Microsoft Excel 2003), с использованием t-теста при уровне значимости 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения уровня БАСК, характеризующей активность гуморального звена иммунитета рыб, представлены в таблице 1.

Исследованные препараты проявили иммуностимулирующий эффект, который при использовании метилурацила достигает пика на 11 сут эксперимента (сразу после завершения кормления) с последующим снижением. Аналогичный эффект ксимедона наблюдали на

17 сут эксперимента (7 сут после завершения кормления). Наиболее значимый иммуностимулирующий эффект продемонстрировал ксимедон. Такие результаты соответствовали теоретически ожидаемым, т. к. ксимедон более современное и, согласно литературным данным, активное вещество.

Таблица 1. Динамика БАСК под влиянием пиримидинов

Время, сут	БАСК, %		
	Контроль	Метилурацил	Ксимедон
0	$9,57 \pm 0,08$	–	–
11	$9,80 \pm 0,10$	$9,84 \pm 0,04^*$	$9,82 \pm 0,06$
17	$9,77 \pm 0,02$	$9,73 \pm 0,05$	$9,96 \pm 0,03^*$

Примечание. Здесь и далее: * — различие с контролем достоверно ($p \leq 0,5$).

При анализе данных, полученных в ходе второго этапа экспериментов, в первую очередь необходимо отметить, что все подвергнутые экспериментальным механическим травмам рыбы остались живы. Отмечено активное заживление всех типов ран. Развития микозных осложнений ни в одном случае отмечено не было, что объясняется хорошими зоогигиеническими условиями в аквариумах и использованием качественных полноценных кормов.

Оба соединения продемонстрировали способность стимулировать регенерацию тканей рыб (табл. 2). Наиболее активно происходила эпителизация скоблёных ран на голове, т. к. там наиболее интенсивное кровоснабжение и благоприятная трофика тканей. За счёт высоких показателей в контрольной группе достоверных различий между средними по группам показателями установить не удалось. Хотя отмечена положительная тенденция, согласующаяся с данными полученными при анализе других показателей.

Несколько труднее шло заживление достаточно глубоких резаных ран на спине. Различия средних показателей опытных групп по сравнению с контрольной достоверны при $p \leq 0,05$. Причём наиболее активным регенератором тканей по данному показателю оказался ксимедон, хотя различия при сравнении сред-

Таблица 2. Тканевосстанавливающая активность пиримидинов

Группа рыб	Заживление раны на голове, %	Длина видимого шрама на спинке, см	Восстановление лучей хвостового плавника, %
Контроль	93,0±7,0	4,7±0,3	0,0±0,0
Метилурацил	100,0±0,0	3,1±0,2*	25,0±5,0*
Ксимедон	97,0±4,8	3,0±0,4*	24,0±4,8*

них показателей по опытным группам статистически не существенны.

Наиболее медленно у рыб происходит восстановление утраченных лучей плавников. По всей видимости, это объясняется относительно низким уровнем кровоснабжения этих тканей. Тем не менее, оба вещества продемонстрировали свою способность стимулировать регенерацию тканей. Следует отметить, что наиболее выраженный эффект от применения пиримидинов наблюдали именно тогда, когда естественное восстановление повреждённых тканей затруднено и происходит медленно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведённых исследований удалось установить, что химические соединения, положительно влияющие на процессы иммунитета у человека, могут оказывать сходное влияние и на пойкилотермных животных — рыб. Необходимо отметить, что это влияние достаточно слабое. Поэтому не понятно, будет ли применение этих соединений оказывать значимый терапевтический эффект в производственных условиях. Очевидно, что физиологические различия между гомойотермными и пойкилотермными организмами настолько велики, что у последних возможно отсутствуют некоторые метаболические пути, через которые реализуется фармакологическое действие рассматриваемых препаратов.

Наиболее перспективным, на наш взгляд, направлением дальнейших исследований могут стать эксперименты по оценке протективного действия пиримидинов при экспериментальных инфекциях и инвазиях рыб. При обнаружении позитивного влияния можно будет говорить об актуальности исследований направленных на подробную расшифровку механизма их действия на организм рыб.

ЛИТЕРАТУРА

- Гаврилин К.В. 2012. Протозойно-бактериальные болезни пресноводных рыб и меры борьбы с ними. Дисс. ...док. биол. наук. М.: ГНУ «ВИГИС». 368 с.
- Головин П.П. 1984. Стресс-факторы в индустриальном рыбоводстве, их влияние на рыб и меры предупреждения. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.: 21 с.
- Грищенко Л.И., Рудиков Н.И. 1985. Проблемы патологии и иммунитета при инфекционных болезнях рыб // Икhtiология (Итоги науки и техники). М.: ВИНТИ. Т. 1. С. 190–211.
- Котов С.В., Калинин А.П., Рудакова И.Г. 2002. Диабетическая полинейропатия. М.: Медицина. 439 с.
- Лукьяненко В.И. 1984. Иммунобиология рыб: врожденный иммунитет. М.: Легкая и пищевая промышленность. 272 с.
- Микряков В.Р. 1991. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН. 153 с.
- Слабнов Ю.Д., Черепнев Г.В., Цибульский А.П. 1997. Влияние пиримидиновых производных на систему регуляции активного транспорта кальция в иммунокомпетентных клетках // Экспериментальная и клиническая фармакология. Т. 6. С. 44–46.
- Слабнов Ю.Д., Черепнев Г.В., Каримова Ф.Г., Гараев Р.С. 1998. Влияние пиримидиновых производных на аденилатциклазную систему регуляции иммунокомпетентных клеток *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. № 6. С. 663–665.
- Смирнова О.В., Кузьмина Т.А. 1966. Определение бактерицидной активности сыворотки методом нефелометрии // Журн. микробиол. № 4. С. 8–11.
- Wahli T., Frischknecht R., Schmit M., Gabaudan J., Verlhac V., Meier W.A. 1995. Comparison of the effect of silicone coated ascorbic acid and ascorbic phosphate on the course of ichthyophthiriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) // Fish Diseases. № 4. P. 347–355.

REFERENCES

- Gavrilin K.V.* 2012. Protozoino-bakterial'nye bolezni presnovodnyh ryb i mery bor'by s nimi [Protozoal and bacterial diseases of freshwater fish and methods of their control]. Diss. ... dok. biol. nauk. M.: GNU «VIGIS», 368 s.
- Colovin P.P.* 1984. Stress-factory v industrial'nom rybovodstve, ih vliyanie na ryb i mery preduprezhdeniya [Stress factors in industrial fish farming, their impact on the fish and prevention measures]. Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk. M.: 21 s.
- Grishchenko L.I., Rudikov N.I.* 1985. Problemy patologii i immuniteta pri infekcionnyh boleznyah ryb [Problems of disease and immunity to infectious diseases] // *Ihtiologiya (Itogi nauki i tekhniki)*. M.: VINITI. T.1. С. 190–211.
- Kotov S.V., Kalinin A.P., Rudakova I.G.* 2002. Diabeticheskaya polinejropatiya [Diabetic polyneuropathy]. M.: Medicina. 439 s.
- Luk'yanenko V.I.* 1984. Immunobiologiya ryb: vrozhdennyj immunitet [Immunobiology fish: innate immunity] M.: Legkaya i pishhevaya prom-st'. 272 s.
- Mikryakov V.R.* 1991. Zakonomernosti formirovaniya priobretnennogo immuniteta u ryb [Regularities of formation of acquired immunity in fishes]. Rybinsk: IBVV RAN. 153 s.
- Slabnov YU.D., Cherepnev G.V., Cibul'kin A.P.* 1997 a. Vliyanie pirimidinovyh proizvodnyh na sistemu regulyatsii aktivnogo transporta kal'ciya v immunokompetentnyh kletkah [Influence of pyrimidine derivatives on calcium active transport regulation system in immunocompetent cells]. *Ehksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. T. 6. S. 44–46.
- Slabnov YU.D., Cherepnev G.V., Karimova F.G., Garaev R.S.* 1998. Vliyanie pirimidinovyh proizvodnyh na adenilatciklaznuyu sistemu regulyatsii immunokompetentnyh kletok in vitro [Effect of pyrimidine derivatives at adenylate cyclase system of regulation of immune cells in vitro] // *Byulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny*. № 6. S. 663–665.
- Smirnova O.V., Kuz'mina T.A.* 1966. Opredelenie baktericidnoj aktivnosti syvorotki metodom nefelometrii [Determination of serum bactericidal activity by nephelometry] // *Zhurn. mikrobiol.* № 4. S. 8–11.

Поступила в редакцию 20.05.16 г.
Принята после рецензии 17.07.16 г.

The possibility assess of use of preparations for stimulate metabolic processes, for correction of stress and accelerate the regeneration tissue of fish

K.V.Gavrilin¹, T.A.Suvorova², A.K.Ponomarev¹

¹ Moscow state university of technologies and management

² I.D. Papanin Institute for biology of inland waters RAS

The health care of aquatic organisms propagated in aquaculture faces the challenge of correcting fish immunosuppressions of different geneses. The development of opportunistic infections relates to immunosuppression. Immuno-physiological status of farmed fish is directly related to fish-breeding and as a consequence to economic indicators, in fish farms. This is why searching for the tools for the correction of the fish immune status is a topical task. The goal of our study was to evaluate the possibility of application for fish health care of the substances positively influencing metabolic processes, xymedon and methyluracil, widely used in human medicine as immunostimulants. In a series of experiments common carp (*Cyprinus carpio*), the main subject of the aquaculture of Russian Federation, was used. The experiments aimed in the assessment of impact of the above immunostimulants on laboratory parameters characterizing the intensity of anti-infection immunity in fish (bactericidal activity of blood serum) and regeneration of tissue following mechanical damages. It was revealed that both substances positively influence the humoral immunity in carp, exhibiting impact on the indicators characterizing the cellular-mediated part of the immune system and stimulate the regeneration.

Keywords: stress, immunity, xymedon, methyluracil, the bactericidal activity of blood serum, regeneration of tissue.