

ИЗУЧЕНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ИМУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ ВИРАЩИВАНИЯ МОЛОДИ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ В УСЛОВИЯХ ИНДУСТРИАЛЬНОЙ АКВАКУЛЬТУРЫ

Н.Н. Матвиенко¹, И.А. Кравченко², А.И. Мрук¹

¹*Институт рыбного хозяйства Национальной академии аграрных наук Украины, Киев*

²*ООО «Лаваретус», Киевская область*

Аквакультура является одной из перспективных отраслей животноводства. Стремительный рост этой отрасли в первую очередь связан со значительным уменьшением природных запасов рыбы и освоением внутренних водных ресурсов. Стагнация коммерческого рыболовства привела к росту роли аквакультуры, которая в течение последних двух десятков лет стала сектором, наиболее интенсивно развивающимся в сфере производства продуктов питания. [7;13]. Это стало возможным в основном за счет индустриализации, суть которой заключается в том, что за счет возможности полного контроля параметров среды создаются оптимальные условия выращивания, благодаря которым удается достичь высокой плотности посадки и получения товарной рыбной продукции в течение целого года; для кормления объектов культивирования используются полноценные сбалансированные корма, обеспечивающие их высокий темп роста. Кроме того, для индустриальной аквакультуры присуща высокая степень механизации и автоматизации всех производственных процессов, обеспечивающая максимальное повышение производительность труда. Однако, вызовы, которые стоят перед современной аквакультурой - ускорение темпов выращивания, повышения устойчивости к заболеваниям гидробионтов в условиях уплотненной посадки, создание высокопроизводительных функциональных кормов, - не могут быть преодолены без применения биотехнологических подходов [2; 8].

В последнее время в Украине активно развивается форелеводство. Ежегодно в Украине выращивается около 130 тыс. тонн форели. Интерес к выращиванию лососевых

видов рыб в условиях РЕЦ (рециркуляционных систем) связан не только с целью их товарного выращивания (в основном радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*), но и с целью восстановления природных популяций этих рыб в реках Карпатского региона, а это ручьевая форель (*Salmo trutta fario*), хариус (*Thymallus thymallus*) и дунайский лосось (*Hucho hucho*). Одним из наиболее действенных путей по повышению рыбопродуктивности водоемов Карпатского региона при недостаточном уровне естественного воспроизведения является осуществление искусственного размножения в условиях индустриальной аквакультуры с последующей реинтродукции полученной молодежи в природные гидроэкосистемы. [10].

Одновременно с интенсификацией процессов выращивания различных видов рыб, появляются новые вирусные болезни, которые наносят ощутимый ущерб аквакультуре [1]. У рыб обнаружено более 250 вирусов, из которых основная часть - в странах с высокоразвитой аквакультурой (США, Франция, Германия, Великобритания, Италия, Норвегия, Япония и др.). Но степень их распространения в различных странах неодинакова. Известно, что убытки рыбоводству наносят заболевания, вызываемые РНК-содержащими вирусами.

Поиск и разработка способов применения новых безопасных и эффективных препаратов, обладающих иммуномодулирующим влиянием на организм рыбы и обладающим выраженным противовирусным действием в отношении РНК-содержащих вирусов, является одним из современных направлений совершенствования биотехнологии разведения лососевых рыб. Развитие этих исследований неразрывно связано с решением многих вопросов. К ним относятся критерии отбора препаратов, изучение их влияния на организм рыб в целом и, в частности, факторы врожденной резистентности, составление и обоснование схем практического применения этих средств.

Одним из необходимых шагов в изучении возможности применения противовирусного препарата в терапевтическом алгоритме является оценка его максимально переносимой концентрации (МПК) [3]. Этот показатель определяли для следующих препаратов:

«Протефлазид» - препарат разработан НПК «Экофарм» Украина г. Киев. Препарат содержит карбоновые кислоты в пересчете на яблочную кислоту - 6.3 г, флавоноидов в пересчете на рутин - 0.32 г (флавоноидные гликозиды, выделенные из диких злаков *Deschampsia caespitosa* L. и *Calamagrostis epigeios* L.), способны подавлять вирусоспецифические ферменты - ДНК-полимеразы и тимидинкиназу в вирус-инфицированных клетках. Это приводит к снижению или полному блокированию репликации вирусов. В то же время «Протеофлазид» ® вызывает увеличение продукции эндогенных альфа- и гамма-интерферонов, что повышает неспецифическую резистентность организма к вирусной и бактериальной инфекции, нормализует иммунный статус. Препарат обладает антиоксидантной активностью, так как препятствует накоплению продуктов перекисного окисления липидов и тем самым ингибирует течение свободнорадикальных процессов [6]. Для исследования был использован концентрат препарата 20 мл которого растворяли в 4 мл питательной среды. Исследуемые вещества растворяли в среде RPMI-1640 или Игла ДГЭС, фильтровали через стерилизующие фильтры фирмы "Sarstedt", Германия, с размером пор 0,22 мкм. Рабочие разведения препаратов готовили на ростовой среде (95% среды RPMI-1640 с 5% сыворотки эмбриона теленка).

Препарат «Витан», разработанный учеными Института биологии животных НААН, представляет собой комплексный препарат, действующим веществом в котором является γ -кроднонотоклатон. «Витан» – это препарат для стимуляции иммунной системы, профилактики и лечения заболеваний у рыб и повышения рыбопродуктивности водоемов. - ТУ У 24.4. 309950114. 002. - 2003 [9].

В исследованиях был использован препарат «Изатизон» в водорастворимой форме. «Изатизон» – комплексный, противовирусный, антибактериальный, антигрибковые и иммуномодулирующий препарат, который имеет широкий спектр действия, обеспечивая высокий лечебно-профилактический, противовоспалительный и антигистаминный эффекты,

повышает резистентность организма животных к вирусным инфекциям. При аэрозольном применении препарат легко проникает через биологические барьеры, блокирует репродукцию вирусов, подавляет размножение патогенных микроорганизмов. «Изатизон» - комплексный препарат, в состав которого входят вещества, применяемые как самостоятельные средства в медицинской практике, а именно метисазон (марборан), диметилсульфоксид (димексид) и полиэтиленгликоль с молекулярной массой 400. Во время работы использовали препарат "Изатизон", изготовленный в условиях лаборатории МСБАР ИМ-БиГ НАН Украины (патент Украины №1780, 1994, ТУ У 46.15 -341-98), чистота продукта доказана методами химического анализа [4].

Препарат «Гропринозин» (Inosine pranobex). Активным веществом этого препарата является инозин пранобекс – молекулярный комплекс инозина и 1- (диметил амино) -2-пропанол-4-ацетиаминбензоату в соотношении 1: 3. Препарат имеет противовирусное и иммуностимулирующее действие. Фармакологически активным веществом является инозин, а второй компонент повышает его биологическую доступность для лимфоцитов и других клеток. Противовирусное действие обусловлено замедлением репликации РНК и ДНК-геномных вирусов через повреждения кода генетической информации. Иммуностимулирующее действие обусловлено влиянием на Т-лимфоциты (активизация синтеза цитокинов) и повышением фагоцитарной активности макрофагов. Препарат усиливает дифференциацию пре-Т-лимфоцитов, стимулирует индуцированную митогенами пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, повышает функциональную активность Т-лимфоцитов, в том числе их способность к образованию лимфокинов, нормализует соотношение между субпопуляциями Т-хелперов и Т-супрессоров (иммунорегуляторный индекс). Препарат предотвращает поствирусное ослабление клеточного синтеза РНК и белка в клетках, которые были инфицированы, и это особенно важно в отношении клеток, которые задействованы в процессах иммунной защиты организма. Такое действие «Гропринозина» не относится к вирусной РНК, синтез которой одновременно замедляется. Таким образом, препарат оказывает тимозиноподобное действие - стимулирует клеточный иммунитет, особенно эффективно в условиях клеточного иммунодефицита. В результате уменьшается вирусная нагрузка на организм, сокращается продолжительность болезни, ограничивается раннее и часто ненужное назначение антибиотиков, уменьшается риск возникновения осложнений и повторного инфицирования, восстанавливаются функции иммунной системы [5,11,12].

Нами определены максимально допустимые концентрации (МДК) исследуемых препаратов для работы в культурах клеток, что было важно для оценки возможности их дальнейшего использования в качестве противовирусных веществ. Степень ЦПД (цитопатического действия) определяли по изменениям морфологии клеток (округление, сморщивание клеток, отторжения от поверхности лунок продегенерированных клеток) за 4-плюсовой системой. Под МДК препарата считали его наибольшее количество, не вызвала дегенерацию клеток. Определено, что при концентрациях «Протефлазида» - 19,5 мкг / мл, «Изатизона» - 12,5 мкг / мл, «Гропринозина» - 62,5 мкг / мл, «Витана» - 96 мкг / мл и более низких концентрациях в культурах клеток через 96 часов не наблюдали дегенеративные изменения монослоя и все линии клеток сохраняли способность к дальнейшему культивированию. При применении в культурах клеток ЕРС, RTG-2 указаны концентрации и составили МДК. При тестировании высоких концентраций в обеих линиях клеток уже через 24-28 часов наблюдали дегенерацию клеточного монослоя: клетки округлялись, отделялись от поверхности лунок, менялось рН среды в сторону уменьшения этого показателя. Таким образом, высокие дозы препаратов обладали цитотоксическим действием.

Для определения минимально активной концентрации (МАК) тест-вируса в дозе 100 ТЦД₅₀ / 0,1 мл вносили в культуру клеток и инкубировали в течение 1 часа при температуре 15,5 °С. После адсорбции вируса на клетках его удаляли и клетки отмывали питательной средой, после чего в поддерживающую среду (Sigma DMEM + 2% фетальной сыворотки) вносили препараты в соответствующих концентрациях. В качестве тест-вируса ис-

пользовали вирус инфекционного панкреатического некроза (IPNV). Исследования проводились на культуре клеток RTG-2.

Отсутствие ЦПД в опыте, при наличии его в контроле вируса, а также разница инфекционного титра в опыте по сравнению с контролем вируса позволили рассчитать МАК препарата. Минимально активную концентрацию (МАК) соединения определяли как наименьшее разведение препарата, которое защищало 50% клеток от IPNV, при наличии 100% ЦПД вируса в контроле.

Химиотерапевтический индекс (ХТИ) препарата относительно тест-вируса определяли путем установления соотношения МДК к минимально активной концентрации (МАК), который представляет собой минимальное количество препарата, тормозит развитие вирусоспецифическое ЦПД на 50%.

Самая высокая величина этого показателя обнаружена у препарата «Гропринозин» - 2500 Итак, эффективным веществом, среди указанных выше препаратов, оказался «Гропринозин». Чуть меньше, хотя одинаково эффективно, подавляли репродукцию вируса препараты «Протефлазид» и «Изатизон». Но учитывая комплексность действия «Изатизона» (непосредственно противовирусное и иммуномодулирующее), а также высокую стоимость как «Гропринозина», так и «Протефлазида», перспективность «Изатизон» в качестве противовирусного средства в рыбоводстве становится более обоснованным. Исходя из того обстоятельства, что механизмы противовирусного действия «Гропринозина» и «Изатизон» принципиально разные, также открываются возможности комплексного применения этих агентов с целью усиления противовирусного эффекта

Для определения антивирусного действия в качестве тест-объекта был выбран вирус инфекционного панкреатического некроза (IPNV) украинский изолят VF-1 Вирусы поддерживали серийными пассажирами в чувствительных культурах клеток.

Анализируя полученные результаты можно констатировать, что исследуемые препараты имели противовирусную активность к IPNV от $1 \pm 0,02$ до $6 \pm 0,02$ lg ID₅₀ Вещества, которые снижают титр инфекционного вируса в условиях одноциклового опыта на 1,25-2 lg ID₅₀ считаются активными и перспективными для дальнейших исследований. Таким образом в результате проведенных исследований показана высокая антивирусная активность в отношении IPNV препаратов группы флавоноидов ("Протефлазид"- показатель ингибирования (ПИ) $6,0 \pm 0,02$ lg ID₅₀) и препарата «Гропринозин» (ПИ- $6,0 \pm 0,03$ lg ID₅₀). Препарат «Изатизон» (ПИ $2,0 \pm 0,02$ lg ID₅₀) также обладает выраженными антивирусными свойствами. Относительно препарата «Витан» (ПИ- $1,0 \pm 0,02$ lg ID₅₀), он обнаружил низкую активность и его целесообразно применять как иммуномодулирующее препарат.

Проведенная нами работа является только одним из этапов по изучению применения иммуномодулирующих препаратов в биотехнологии выращивания лососевых видов рыб в условиях индустриальной аквакультуры и требует дальнейшего изучения их использования в производственных условиях с составлением схем их практического применения.

Список использованных источников

1. Бучацкий Л. П. Вирусные инфекции морских и пресноводных животных. – К: УДЖ, Ноосфера, 1994. – С 94 – 95.
2. Бучацкий, Л.П.. Биотехнология аквакультуры рыб /Л. Бучацкий // *Biotechnologia acta.* – 2013.– №6.– 45–57.
3. Галегов Г. А. Химиотерапия вирусных инфекций / Г. А. Галегов, В. Л Андропова, под ред. Д.К. Львова // *Медицинская вирусология. Руководство.* – М., 2008.– С. 87–92.
4. Заика Л. А. Противовирусные, противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства лечебного препарата изатизон: Монография / Заика Л. А., Болсунова О. И., Потопальский А. И. – К. : Колообиг, 2010. – 212 с.

5. Земсков В. М. Иммуномодулирующие свойства препаратов инозина и их аналогов/ В. М. Земсков // Успехи современной биологии. – 1989. –№107 (1). – С.69–78.
6. Порва Ю. И. Моделирование инфекции вирусного гепатита С in vivo и изучение антивирусного действия препаратов группы флавоноидов и эллаготанинов.: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. биол. наук : 03.00.06 / Порва Юлия Ивановна; Киевский Национальный университет им. Тараса Шевченко – 2010. – 19 с.
7. Состояние мирового рыболовства и аквакультуры // Вклад в обеспечение продовольственной безопасности и питания: отчет. ФАО. – Рим, 2016.
8. Сучасні методи біотехнології у рибництві /Л.П Бучацький, Ю.П Рудь, О.В Залоїло, І.А Залоїло. – К: ДІА, 2018.–191с
9. Тушницька Н. Й. Вплив препарату «Вітан» на білковий профіль крові і активність антиоксидантної системи в організмі коропа при різних способах його застосування / Н. Й. Тушницька, Т. О. Сокирко, В. Г. Янович // Рибгосподарська наука України. – 2007. – № 2. – С. 47–50.
10. Худий, О.І. Созологічна характеристика іхтіофауни басейнів Дністра, Пруту та Сірету в межах Карпатського регіону України. / О.І Худий, Л.В Худа, //Сучасні проблеми теоретичної і практичної іхтіології: IX міжнар. Іхтіол. Наук.–практ. конф., 14–16 вер. 2016р.: тези доп. – Одеса,22016. – С. 276–279
11. Immunological and clinical study on therapeutic efficiency of inosine pranobex / M. Golebiowska–Wawrzyniak, K Markiewicz, A. Kozar [et al.] // Pol. Mercuriusc. Lek. – 2005. – Vol.19. – P. 379–382.
12. Pathogenesis of *Birnaviridae* – influence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) on cell–mediated immunity, total Ig level and lysozyme activity in Salmonid / A.K. Siwicki, E. Terech–Majewska, J. Szarek [et al.] // Pol.J. Vet. . – 2004. – Vol. 3. – P. 127–129.
13. Simpson, S. The blue food revolution: Making Aquaculture a Sustainable Food Source. / S Simpson // Scientific American. – 2011.–. Vol 304, iss 2.– P. 54–61.