

**ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

СОЛОПОВА ХРИСТИНА ЯРОСЛАВІВНА

УДК [597-12:639.371.52]:[597-1.05:612]

ДИСЕРТАЦІЯ

**СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ Й ІМУННОЇ СИСТЕМ У КОРОПІВ,
УРАЖЕНИХ АЕРОМОНОЗОМ І САПРОЛЕГНІОЗОМ, ТА ЇХ
ЛІКУВАННЯ**

03.00.04 – біохімія
ветеринарні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук

Дисертація містить результати власних досліджень.
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на
відповідне джерело _____ Х.Я.Солопова

Науковий керівник – **Віщур Олег Іванович**, доктор ветеринарних наук,
професор

Львів – 2021

АНОТАЦІЯ

Солопова Х.Я. Стан антиоксидантної й імунної систем у коропів, уражених аеромонозом і сапролегніозом, та їх лікування. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біології тварин НААН, Львів, 2021.

Мета дисертаційної роботи полягала у визначенні біохімічного профілю, активності імунної й антиоксидантної систем захисту у коропів за ураження аеромонозом та асоційованої інфекції аеромонозу з сапролегніозом. З'ясувати вплив антибактеріального та синбіотичного препаратів на активність вказаних систем у коропів, хворих аеромонозом.

Експериментальні дослідження проведені в Інституті біології тварин НААН та Інституті рибного господарства НААН упродовж 2016–2019 рр.

На першому етапі дисертаційної роботи з'ясовували інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів, активність системи імунного й антиоксидантного захисту в організмі коропів, хворих на аеромоноз та асоційовану інфекцію аеромонозу з сапролегніозом. Дослідження проводилися на 3-х групах дволіток коропа по 10 особин у кожній. Контрольну групу, становили клінічно здорові риби, перша дослідна група – коропи хворі на аеромоноз, друга дослідна група – коропи хворі асоційованою інфекцією – аеромонозом з сапролегніозом. Матеріалом для дослідження слугувала кров, яку брали із серця риб за допомогою піпетки Пастера, попередньо застосовували наркоз з використанням ефірної олії гвоздики (*Oleum Caryophylli*) та зразки тканин гепатопанкреасу.

Проведені дослідження виявили, що ураження коропів збудниками аеромонозу в поєднанні з сапролегніозом спричиняє інгібуючий вплив на активність ключових ензимів антиоксидантної системи. Зокрема знижується каталазна ($p < 0,05$) та супероксиддисмутазна ($p < 0,01$) активність у гепатопанкреасі коропів, хворих аеромонозом асоційованим з сапролегніозом в

порівнянні з клінічно здоровими рибами контрольної групи. При цьому виявлено зниження супероксиддисмутази активності ($p < 0,05$) у коропів хворих аеромонозом, у порівнянні з контрольною групою. Вміст дієнових кон'югатів, у гепатопанкреасі риб першої і другої дослідних груп зростає ($p < 0,05$), у порівнянні з контролем. Разом з цим у гепатопанкреасі коропів за асоційованої інфекції виявлено тенденцію до зростання вмісту кінцевого продукту ПОЛ – ТБК-активних продуктів. Ці дані свідчать про більший інгібуючий вплив асоційованої інфекції на інтенсивність процесів ПОЛ в організмі коропів.

Констатовано підвищення активності гуморальних механізмів неспецифічної резистентності за ураження коропів збудниками аеромонозу асоційованого з сапролегніозом. Про що свідчать вірогідне підвищення бактерицидної і лізоцимної активності сироватки крові та збільшення вмісту циркулюючих імунних комплексів у коропів дослідних груп стосовно контрольної. Водночас, за дії чинників захворювання у риб обох дослідних груп, порівняно з контрольною, виявлено вірогідне зниження концентрації гемоглобіну і кількості еритроцитів крові, що вказує на порушення оксиген-транспортної функції крові.

Захворювання коропів на аеромоноз та асоційовану інфекцію аеромонозу з сапролегніозом спричиняє імуносупресивний вплив на ефекторну ланку імунної відповіді – зменшується кількість Т-лімфоцитів (загальних і теофілін-чутливих) та знижується функціональна активність ТЕ-РУЛ. При цьому у крові хворих коропів зафіксовано зменшення кількості антигензв'язуючих В-лімфоцитів, а також низькоавідних їх форм за одночасного збільшення неактивних ЕАС-РУЛ. Вказані зміни були виражені більшою мірою у крові коропів, уражених асоційованою інфекцією аеромонозу та сапролегніозу.

Мета другого етапу досліджень – з'ясування впливу антибактеріального препарату «Флюмек» самотійно та в комплексі з насінням розторопші плямистої (*Silybum marianum*) на інтенсивність процесів ПОЛ й активність

ензимів системи антиоксидантного захисту, гематологічні показники, стан природного й адаптивного імунітету у здорових і хворих аеромонозом коропів.

З метою вивчення вказаних питань проведено два досліді. У першому досліді з'ясовували вплив різних доз антибактеріального препарату «Флюмек» на гематологічний профіль, стан системи антиоксидантного захисту й імунного потенціалу у клінічно здорових дволіток коропа. Для цього було сформовано 3 групи клінічно здорових коропів по 10 особин у кожній. Контрольна група риб отримувала лише 3%-у крохмальну суспензію. Першій дослідній групі, через зонд упродовж 7 днів задавали антибактеріальний препарат «Флюмек» з розрахунку 10 мг/кг маси риби у складі 3%-ої крохмальної суспензії, а другій дослідній групі – 20 мг/кг маси риб.

Встановлено, що пероральне введення коропам у складі 3%-ої крохмальної суспензії різних доз препарату «Флюмек» спричиняло інгібуючий вплив на інтенсивність утворення первинних продуктів ПОЛ (дієнових конюгатів) у гепатопанкреасі риб, проте істотно не змінювало рівень ТБК-активних продуктів. При цьому виявлено вищу супероксиддисмутазну активність у гепатопанкреасі коропів, яким задавали досліджуваний препарат дозою 10 мг/кг маси риб. Констатовано дозозалежний імуносупресивний вплив препарату «Флюмек» на активність гуморальної ланки природних механізмів захисту риб, зокрема бактерицидної і лізоцимної активності сироватки крові. Водночас за дії досліджуваного препарату не виявлено змін оксиген-транспортної функції крові риб. За введення коропам у складі 3%-ої крохмальної суспензії препарату «Флюмек» дозою 20 мг/кг маси риб разом з підвищенням фагоцитарного числа констатовано зростання на 19,9 % вмісту ЦІК, що вказує на антигенне навантаження на організм риб.

Препарат «Флюмек» істотно не впливав на кількість Т-лімфоцитів (активних і теофілін-чутливих) та В-лімфоцитів крові та їх функціональну активність. Водночас пероральне введення коропам препарату дозою 20 мг/кг маси риби спричиняло зменшення у крові кількості загальних і теофілін-резистентних Т-лімфоцитів. При цьому встановлено зниження їх

функціональної активності за рахунок перерозподілу рецепторного апарату (збільшення кількості неактивних і зменшення низькоавідних їх форм).

Метою другого досліду було з'ясування впливу антибактеріального препарату «Флюмек» самотійно та в комплексі з насінням розторопші плямистої (*Silybum marianum*) на інтенсивність процесів ПОЛ й активність ензимів системи антиоксидантного захисту, гематологічні показники, стан природного й адаптивного імунітету у здорових і хворих аеромонозом коропів. Для виконання цього завдання було сформовано чотири групи дволітки коропа по 10 особин у кожній. Риби I групи були клінічно здорові, II-IV групу становили клінічно хворі на аеромоноз риби. Перша група – контрольна, клінічно здорова риба отримувала 3%-у крохмальну суспензію, друга група – хвора аеромонозом риба, отримувала лише 3%-у крохмальну суспензію, третій групі – через зонд упродовж 7 днів вводили антибактеріальний препарат «Флюмек» з розрахунку 10 мг/кг маси риби у складі 3%-ї крохмальної суспензії, четвертій групі – окрім аналогічної дози антибактеріального препарату задавали ще 5 % меленого насіння розторопші плямистої.

Одержані результати дослідження антимікробної чутливості польових штамів *Aeromonas hydrophila*, виділених від хворих на аеромоноз коропів, показали, що зберігається високий рівень чутливості аеромонад до антибіотиків фторхінолонового ряду, в тому числі до флюмеквіну, діючої речовини антибактеріального препарату «Флюмек».

Проведені дослідження встановили, що захворювання коропів аеромонозом призводить до підвищення вмісту загального протеїну у сироватці крові. При цьому необхідно зауважити, що у сироватці крові коропів, яким разом із антибактеріальним препаратом «Флюмек» задавали 5 % насіння розторопші плямистої, зафіксовано тенденцію до зниження вмісту загального протеїну. захворювання коропів на аеромоноз спричиняє інгібуючий вплив на білоксинтезувальну функцію печінки, призводить до підвищення у крові вмісту загального протеїну, β - і γ -глобулінів, що вказує на зростання напруги імунної системи. Констатовано відсутність істотного впливу досліджуваних препаратів

на вміст загального протеїну і співвідношення його фракцій у сироватці крові хворих на аеромоноз короїв.

Констатовано нормалізуючий вплив досліджуваних препаратів на вміст альдегідних та кетонів похідних окиснювальної модифікації протеїнів, гідроперекисів ліпідів і ТБК-активних продуктів у крові та гепатопанкреасі короїв, хворих на аеромоноз. При цьому пероральне введення хворим короїв досліджуваних лікувальних препаратів спричиняло вірогідне підвищення каталазної активності. Вказаний вплив був виражений більшою мірою у короїв, яким задавали препарат «Флюмек» і насіння розторопші плямистої.

Встановлено, що введення хворим на аеромоноз короїв досліджуваних препаратів, особливо за умов поєднаного застосування антибактеріального препарату з меленим насінням розторопші плямистої, спричиняло оптимізуючий вплив на кількість Т-лімфоцитів (загальних і теофілінчутливих) і В-лімфоцитів крові та їх функціональну активність.

Мета третього етапу досліджень полягала у з'ясуванні впливу синбіотичного препарату «Ентеронормін», активованого водним розчином йоду і селену, на стан імунного й антиоксидантного захисту у короїв, хворих аеромонозом. Дослідження проводилися на 3-х групах дволітки корої по 10 особин у кожній. Контрольна група, яку становили клінічно здорові риби, отримувала лише 3%-у крохмальну суспензію, перша дослідна група – хворі аеромонозом корої, яким задавали лише 3%-у крохмальну суспензію, другій дослідній групі, яку становили хворі аеромонозом корої, через зонд упродовж 7 днів задавали препарат «Ентеронормін», з розрахунку 2 мг/кг маси риби у складі 3%-ї крохмальної суспензії.

Захворювання короїв асоційованою бактеріальною формою аеромонозу спричиняє імуносупресивний вплив на показники природної резистентності організму. Зокрема, зафіксовано зниження фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів і лізоцимної активності сироватки крові на тлі збільшення вмісту циркулюючих імунних комплексів і фагоцитаного індексу. Констатовано реабілітуючу дію синбіотичного препарату «Ентеронормін на

показники клітинної і гуморальної ланок неспецифічної резистентності організму риб, хворих на асоційовану бактеріальну форму аеромонозу.

У гепатопанкреасі коропів, яким застосовували досліджуваний синбіотичний препарат, виявлено в 1,5 разу ($p < 0,05$) вищу супероксиддисмутазну активність на тлі зниження 2,3 разу ($p < 0,05$) вмісту ТБК-активних продуктів і 3,1 разу ($p < 0,01$) кетонових похідних окиснювальної модифікації протеїнів.

Констатовано імуносупресивний вплив чинників цього захворювання на активність природних механізмів захисту у досліджуваних риб. Зокрема, у хворих коропів виявлено тенденції до зниження фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів на тлі вірогідного збільшення вмісту циркулюючих імунних комплексів, лізоцимної активності сироватки крові та фагоцитаного індексу. При цьому встановлено реабілітуючу дію синбіотичного препарату «Ентеронормін» на показники клітинної і гуморальної ланок неспецифічної резистентності організму риб, хворих на асоційовану бактеріальну форму аеромонозу.

Аналіз результатів досліджень показав, що захворювання коропів асоційованою бактеріальною формою аеромонозу спричиняє імуносупресивний вплив на стан Т- і В-клітинної ланок специфічного захисту організму риб. Констатовано інгібуючий вплив цього захворювання на лімфоцитогенез та функціональну активність імунокомпетентних клітин у крові коропів. Застосування коропам у складі 3%-ї крохмальної суспензії препарату «Ентеронормін» спричиняло нормалізуючий вплив на стан Т-клітинної ланки специфічного захисту, проте істотно не вплинуло на кількість ЕАС-РУЛ і їх функціональну активність.

Наукова новизна. Уперше проведено комплексне дослідження і порівняльний аналіз біохімічних та імунологічних показників, що характеризують гематологічний профіль, стан природного й адаптивного імунітету, інтенсивність процесів ПОЛ, активність системи антиоксидантного захисту у коропових риб, уражених аеромонозом та асоційованою інфекцією аеромонозу

з сапролегніозом. З'ясовано вплив антибактеріального та синбіотичного препаратів на активність вказаних систем у короїв, хворих аеромонозом.

Вперше експериментально досліджено антибактеріальний препарат «Флюмек», вивчено його вплив на біохімічний профіль, активність імунної й антиоксидантної систем як у здорових риь, так і уражених збудником аеромонозу. Запропоновано схеми застосування препарату «Флюмек» для лікування короїв риь за аеромонозу. Вперше експериментально досліджено ефективність застосування синбіотичного препарату «Ентеронормін», активованого водним розчином йоду і селену, у короїв за ураження збудником аеромонозу.

Наукову новизну одержаних результатів підтверджено деклараційним патентом України на корисну модель № 144100 «Спосіб лікування аеромонозу коропа» від 10.09.2020 р.

Практичне значення одержаних результатів. З'ясовано біохімічні та імунологічні зміни в організмі короїв, хворих на аеромоноз та асоційовану інфекцію аеромонозу з сапролегніозом, що доповнюють існуючі відомості про патогенез цього захворювання.

На основі одержаних результатів запропоновано «Спосіб лікування аеромонозу коропа», який апробовано у рибогосподарствах Львівської області та рекомендовано до застосування. Апробовано новий антибактеріальний препарат «Флюмек» та синбіотичний препарат «Ентеронормін» і розроблено схеми їх застосування у рибництві.

Результати досліджень покладено в основу «Тимчасової настанови щодо застосування препарату «Флюмек» в рибництві» (*затверджено вченою радою Інституту рибного господарства НААН, протокол № 8 від 18 грудня 2018 р.*) та «Тимчасової настанови щодо застосування препарату «Ентеронормін» в рибництві» (*затверджено вченою радою Інституту рибного господарства НААН, протокол № 6 від 8 грудня 2020 р.*)

Отримані дані використовуються у навчальному процесі в Національному університеті біоресурсів і природокористування України та у

Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького. Рекомендовано для введення у навчальні програми низки дисциплін на ветеринарних та біологічних факультетах вищих навчальних закладів третього і четвертого рівнів акредитації.

Ключові слова: короп, аеромоноз, сапролегніоз, асоційовані інфекції, гематологічні показники, імунологічні показники, антиоксидантна система, Флюмек, Ентеронормін, розторопша плямиста.

ANNOTATION

Solopova Kh. Ya. The state of antioxidant and immune systems in carp affected by aeromonosis and saprolegniosis, and their treatment. – Qualification scientific work on the rights of a manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Veterinary Sciences 03.00.04 – "Biochemistry" – Institute of Animal Biology of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Lviv, 2021.

The aim of the dissertation was to determine the biochemical profile, the activity of the immune and antioxidant defense system in carp to defeat aeromonosis and aeromonosis associated with saprolegniosis. To find out the effect of antibacterial and symbiotic drugs on the activity of these systems in carps with aeromonosis.

Experimental studies conducted at the Institute of Animal Biology of NAAS and the Institute of Fisheries of NAAS during 2016-2019.

At the first stage of the dissertation, the intensity of lipid peroxidation processes, the activity of the immune and antioxidant system in the body of carps, patients with aeromonosis and aeromonosis associated with saprolegniosis were clarified. Studies were conducted on 3 groups of two-years carps with 10 individuals in each. The control group consisted of clinically healthy fish, the first experimental group - carps with aeromonosis, the second experimental group - carps with associated infection - aeromonosis with saprolegniosis. The material for the study

was blood taken from the heart of a fish using a Pasteur pipette after anesthesia with clove essential oil (*Oleum Caryophylli*) and tissue samples of hepatopancreas.

Studies have shown that carp lesions caused by aeromonosis in combination with saprolegniosis have an inhibitory effect on the activity of main enzymes of the antioxidant system. In particular, decreased catalase ($p < 0,05$) and superoxide dismutase ($p < 0,01$) activity in the hepatopancreas of carp with saprolegniosis-associated aeromonosis compared with clinically healthy fish in the control group. There was also a decrease in superoxide dismutase activity ($p < 0,05$) in aeromonosis affected carps, compared with the control group. The content of diene conjugates in the hepatopancreas of fish of the first and second experimental groups increases ($p < 0,05$), compared with the control. At the same time, in the hepatopancreas of carp with associated infection, a tendency to increase the content of the final product of LPO - The content of diene conjugates in the hepatopancreas of fish of the first and second experimental groups increases ($p < 0,05$), compared with the control. At the same time, in the hepatopancreas of carp with associated infection, a tendency to increase the content of the final product of LPO - TBA-active products. These data indicate a greater inhibitory effect of associated infection on the intensity of LPO processes in carp.

An increase in the activity of humoral mechanisms of nonspecific resistance in carps affected associated infection has been stated. This is evidenced by a probable increase in bactericidal and lysozyme activity of serum and an increase in the content of circulating immune complexes in carp experimental groups relative to the control. At the same time, under the influence of disease factors in fish of both experimental groups, compared with the control, a probable decrease in the concentration of hemoglobin and the number of erythrocytes in the blood was detected, which indicates a violation of oxygen transport function of the blood.

Carp disease of aeromonosis and associated infection of aeromonosis with saprolegniosis causes an immunosuppressive effect on the effector immune response - a decrease in the number of T-lymphocytes (common and theophylline-sensitive) and reduced functional activity of T-common lymphocytes. In the blood of sick carp,

a decrease in the number of antigen-binding B-lymphocytes, as well as their low-avid forms with a simultaneous increase in inactive B-lymphocytes. These changes were more pronounced in the blood of carp affected by the associated infection of aeromonosis and saprolegniosis.

The purpose of the second stage of research was to determine the effect of the antibacterial drug «Flumek» alone and in combination with the seeds of milk thistle (*Silybum marianum*) on the intensity of lipid peroxidation and activity of enzymes of AOS, natural and adaptive immunity in healthy and sick aeromonosis carps. In order to study these issues, two experiments were conducted.

At first experiment the effect of different doses of the antibacterial drug «Flumek» on the hematological profile, the state of the antioxidant defense system and the immune potential in clinically healthy two-year-old carp was investigated. For this purpose, 3 groups of clinically healthy carp with 10 individuals in each were formed. The control group of fish received only 3% starch suspension. The first experimental group, through a tube for 7 days was given the antibacterial drug «Flumek» at the rate of 10 mg / kg of fish weight in the composition of 3% starch suspension, and the second experimental group - 20 mg / kg of fish weight.

It was found that oral feeding in a 3% starch suspension of different doses of the drug «Flumek» to carps caused an inhibitory effect on the intensity of the formation of primary products of LPO (diene conjugates) in the hepatopancreas of fish, but did not significantly change the level of TBA-active products. At the same time, higher superoxide dismutase activity was detected in the hepatopancreas of carp, which was given the study drug at a dose of 10 mg / kg of fish weight. The dose-dependent immunosuppressive effect of the drug «Flumek» on the activity of the humoral part of the natural mechanisms of protection of fish, in particular bactericidal and lysozyme activity of blood serum was detected. At the same time, no changes in the oxygen-transport function of fish blood were detected under the action of the studied drug. With feeding the 3% starch suspension with the drug «Flumek» at dose of 20 mg / kg of fish weight to carps, together with an increase in phagocytic

number, also increase for 19,9% in the content of circulating immune complexes, indicating antigenic load on fish.

«Flumek» did not significantly affect the number of T-lymphocytes (active and theophylline-sensitive) and B-lymphocytes in the blood and their functional activity. At the same time, oral feeding the drug at a dose of 20 mg / kg of fish weight to carps caused a decrease in the number of total and theophylline-resistant T-lymphocytes in the blood. At the same time, a decrease in their functional activity due to the redistribution of the receptor apparatus (increase in the number of inactive and decrease in their low-avid forms) was established.

The aim of the second experiment was to determine the effect of the antibacterial drug "Flumek" alone and in combination with the seeds of milk thistle (*Silybum marianum*) on the intensity of LPS and activity of AOS enzymes, hematological parameters, natural and adaptive immunity in healthy and patients with aeromonosis carps.

To perform this task, four groups of two-year old carps were formed, 10 individuals each. Group I fish were clinically healthy, group II-IV were clinically aeromonosis affected carps. The first group - control, clinically healthy fish received 3% starch suspension, the second group - aeromonosis affected carps, received only 3% starch suspension, the third group - through a probe for 7 days was feeding the antibacterial drug «Flumek» at a rate of 10 mg / kg of fish weight in the composition of 3% starch suspension, the fourth group - in addition to a similar dose of antibacterial drug was given another 5% of ground seeds of milk thistle.

Studies have shown that in carp with affected aeromonosis leads to an increase in the content of total protein in the serum. It should be noted that in the blood serum of carp, which together with the antibacterial drug «Flumek» was given 5% of the seeds of milk thistle, there was a tendency to reduce the content of total protein. Carp disease of aeromonosis causes an inhibitory effect on the protein-synthesizing function of the liver, leads to an increase in the content of total protein, β - and γ -globulins in the blood, which indicates an increase in the voltage of the immune system. The absence of a significant effect of the studied drugs on the

content of total protein and the ratio of its fractions in the serum of patients with carp aeromonosis was stated.

The normalizing effect of the studied drugs on the content of aldehyde and ketone derivatives of oxidative modification of proteins, lipid hydroperoxides and TBA-active products in the blood of carp sick with aeromonosis was stated. At the same time, oral administration of the studied drugs to sick carp caused a increase in catalase activity. This effect was expressed to a greater extent in carp, which were given the drug «Flumek» with seeds of milk thistle.

It was found that the introduction of drugs to carps affected with aeromonosis, especially in the combined use of antibacterial drug with ground seeds of milk thistle, caused an optimizing effect on the number of T-lymphocytes (total and theophylline-sensitive), B-lymphocytes and their functional activity.

The purpose of the third stage of research was to determine the effect of the symbiotic drug «Enteronormin», activated by an aqueous solution of iodine and selenium, on the state of immune and antioxidant protection in carp affected with aeromonosis.

The study was conducted on 3 groups of two-year-old carps with 10 individuals each. The control group, which consisted of clinically healthy fish, received only 3% starch suspension, the first experimental group - carps with aeromonosis, who were given only 3% starch suspension, the second experimental group, which consisted of carp aeromonosis, through a probe for 7 days was given the drug «Enteronormin», at the rate of 2 mg/kg of fish weight, as part of a 3% starch suspension.

Disease of carp with the associated bacterial form of aeromonosis causes immunosuppressive effects on the organism natural resistance. In particular, a decrease in the phagocytic activity of neutrophilic granulocytes was recorded against the background of an increase in the content of circulating immune complexes, lysozyme activity of blood serum and phagocytic index. The rehabilitative effect of the symbiotic drug «Enteronormin» on the indicators of cellular and humoral of nonspecific resistance of fish with aeromonosis.

In the hepatopancreas of carp, which was given the studied symbiotic drug, found 1,5 times ($p < 0,05$) higher superoxide dismutase activity on the background of a decrease of 2,3 times ($p < 0,05$) the content of TBA-active products and 3,1 times ($p < 0,01$) ketone derivatives of oxidative modification of proteins.

The immunosuppressive effect of the factors of this disease on the activity of natural defense mechanisms in the studied fish was stated. In particular, in carps with aeromonosis there was a tendency to decrease the phagocytic activity of neutrophilic granulocytes and lysozyme activity of serum against the background of a probable increase in the content of circulating immune complexes and phagocytic index. The rehabilitative effect of the symbiotic drug "Enteronormin" on the indicators of cellular and humoral links of nonspecific resistance of carps with aeromonosis, was established.

It has been established that affecting carps with aeromonosis causes immunosuppressive effects on the state of T- and B-cell units of specific protection of fish. The inhibitory effect of this disease on lymphocytopoiesis and functional activity of immunocompetent cells in the blood of carp has been stated. The use for the carp of the experimental group in the composition of 3% starch suspension of the drug «Enteronormin» caused a normalizing effect on the state of the T-cell unit of specific protection, but did not significantly affect the number of B-cells and their functional activity.

Scientific novelty. For the first time a comprehensive study and comparative analysis of biochemical and immunological parameters characterizing the hematological profile, state of natural and adaptive immunity, intensity of LPO processes, activity of antioxidant defense system in carp fish affected by aeromonosis and aeromonosis associated with saprolegniosis. The influence of antibacterial and symbiotic drugs on the activity of these systems in carp sick with aeromonosis has been clarified.

For the first time, the antibacterial drug Flumec was experimentally studied in fish farming, its effect on the biochemical profile, activity of the immune and antioxidant systems in both healthy fish and aeromonosis affected carps was studied.

Methods of using the drug «Flumek» for the treatment of aeromonosis affected carps are proposed. For the first time, the effectiveness of the use of the symbiotic drug «Enteronormin», activated by an aqueous solution of Iodine and Selenium, in carp for lesions of the pathogen aeromonosis was experimentally investigated.

As a result of the dissertation work, a patent for utility model No. 144100 "A **method of treating carp aeromonosis** " (from 10.09.2020) was obtained.

Practical meaning. Biochemical and immunological changes in the body of carps affected aeromonosis and aeromonosis associated with saprolegniosis were detected, which complement the existing information about the pathogenesis of this disease.

Based on the obtained results, a «Method of treatment of carp aeromonosis» was proposed, which was tested in fish farms of Lviv region and recommended for use. A new antibacterial drug «Flumek» and a symbiotic drug «Enteronormin» were tested and schemes for their use in fish farming were developed.

The results of the research are the basis of the «Temporary guidelines for the use of the drug «Flumek» in fish farming» (approved by the Academic Council of the Institute of Fisheries NAAS, Protocol № 8 of December 18, 2018) and «Temporary guidelines for the use of the drug «Enteronormin» in fish farming» approved by the Academic Council of the Institute of Fisheries of NAAS, Protocol № 6 of December 8, 2020)

The obtained data are used in the educational process at the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine and at the Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology by S. Z. Gzhytsky. It is recommended for introduction into the curriculum of a number of disciplines at veterinary and biological faculties of higher educational institutions of the third and fourth accreditation levels.

Key words: carp, aeromonosis, saprolegniosis, associated infections, hematological parameters, immunological parameters, antioxidant system, Flumek, Enteronormin, milk thistle.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті в наукових фахових виданнях України:

1. **Солопова Х. Я.**, Віщур О.І. Гематологічні та мікробіологічні показники, стан природних механізмів захисту у коропа за дії препарату "Флюмек". *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки.* Львів, 2016. Т. 18, № 3(71). С. 100–104. (Дисертантка виконала експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, написала статтю). <https://doi.org/10.15421/nvlvet7123>
2. Антимікробна активність нового хіміотерапевтичного препарату на основі флюмеквіну щодо *Aeromonas Hydrophila* / **Х. Я. Солопова**, О. І. Віщур, Т.І. Стецько, Г.П. Угрин, О.І. Хом'як. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки.* Львів, 2017. Т. 19, № 82. С. 66–70. (Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, статистично опрацювала отримані дані, написала статтю). <https://doi.org/10.15421/nvlvet8214>
3. **Солопова Х.Я.**, Віщур О.І. Рівень окиснювального пошкодження білків та інтенсивність процесів ПОЛ в організмі коропів, уражених аеромонозом, та за лікування препаратом «Флюмек». *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія «Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва».* Київ, 2018. Вип. 285. С. 351–359. (Дисертантка виконала експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, брала активну участь у аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті).
4. **Солопова Х. Я.** Природні механізми захисту коропових риб за ураження бактерійним аеромонозом і за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін».

Біологія тварин. Львів, 2020, т. 22, №1. С. 46-49.
<https://doi.org/10.15407/animbiol22.01.046>

5. **Солопова Х.Я.**, Віщур О.І. Стан Т- і В-клітинної ланок імунітету коропів, уражених аеромонозом, та за лікування препаратом Ентеронормін. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. Біла Церква, 2020. № 1. С.40–46. (Дисертантка виконала експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, брала активну участь у аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті). <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2020-154-1-40-46>

6. **Солопова Х.Я.**, Віщур О.І., Кориляк М.З., Соловодзінська І.Є. Стан системи антиоксидантного захисту у гепатопанкреасі коропів за асоційованої інфекції аеромонозу з сапролегніозом. *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування*. 2020. № 6. С. 85-89. (Дисертантка виконала експериментальну частину досліджень, провела визначення активності ензимів, статистично опрацювала отримані дані, провела аналіз результатів, підготувала статтю до друку). <https://doi.org/10.31890/vttp.2020.06.15>

Патент України на корисну модель

7. Спосіб лікування аеромонозу коропа : декл. пат. на корис. модель № 144100, Україна / Віщур О.І., Пірус Р.І., **Солопова Х.Я.** № u201907735; заявл. 09.07.2019 ; опубл. 10.09.2020, Бюл. № 17, 4с. (Дисертант брала участь у проведенні дослідів, аналізі результатів досліджень, оформленні патенту)

Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Тези та матеріали конференцій:

8. Матвієнко Н., **Солопова Х.**, Шепелевич В. Асоційована бактеріальна інфекція коропових риб. *Міжнародна наукова конференція «Досягнення та перспективи розвитку мікробіології»: Програма та збірник тез доповідей*. Сполом. Львів, 2016. С. 52–53. (Дисертантка брала участь в опрацюванні літературних джерел, оформленні та написанні тези)

9. **Солопова Х.Я.** Вплив препарату «Флюмек» на показники неспецифічної резистентності коропа. *Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини: матеріали XV Всеукр. наук.-практ. конф. (м. Львів, 8–9 груд. 2016 р.).* Львів, 2016. С. 188.
10. **Солопова Х.Я., Віщур О.І., Морміль Л.В.** Стан гуморальної ланки природної резистентності організму коропів за умов ураження аеромонозом і сапролегніозом. *Збірник матеріалів XVI Міжнародної науково-практичної конференції професорсько-викладацького складу, аспірантів і студентів «Актуальні проблеми ветеринарної медицини».* Київ, 2017. С.108. *(Дисертантка виконала експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, оформила та написала тези)*
11. **Солопова Х.Я.** Антибактеріальна дія препарату «Флюмек» щодо збудника аеромонозу коропів. *Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини: матеріали XVI Всеукр. наук.-практ. конф. (м. Львів, 8– 9 груд. 2017 р.).* Львів, 2017. С. 149.
12. **Солопова Х.Я., Віщур О.І.** Вплив препарату «Флюмек» і його комплексу з насінням розторопші плямистої на вміст загального білка та співвідношення окремих його фракцій у коропів, уражених аеромонозом. *Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини : матеріали XVII Всеукр. наук.-практ. конф. (м. Львів, 6– 7 груд. 2018 р.).* Львів, 2018. С. 137. *(Дисертантка виконала експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, оформила та написала тези, представила матеріали на конференції у вигляді усної доповіді)*
13. **Солопова Х., Кориляк М., Добрянська О.** Вплив препарату «Ентеронормін» на систему антиоксидантного захисту у коропів, уражених аеромонозом. *«Молоді вчені у розв'язанні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини»: матеріали XVIII Всеукр. наук.-практ. конф., (м. Львів, 5-6 груд. 2019 р.).* Львів, 2019. С. 151. *(Дисертантка виконала експериментальну частину досліджень, провела визначення активності ензимів, статистично опрацювала отримані дані, брала участь в*

оформленні та написанні тези, представила матеріали на конференції у вигляді усної доповіді)

14. Солопова Х.Я., Віщур О.І., Соловодзінська І.Є. Вплив препарату «Флюмек» і його комплексу з насінням розторопші на систему антиоксидантного захисту у коропів, уражених аеромонозом. *Збірник матеріалів II Міжнародної науково-практичної конференції "Сучасні проблеми раціонального використання водних біоресурсів" (м. Київ, 27-29 жовтня 2020 р.). Київ, 2020. С. 109-111. (Дисертантка виконала експериментальну частину досліджень, провела визначення активності ензимів, статистично опрацювала отримані дані, брала участь в оформленні та написанні тези)*

15. Солопова Х.Я. Стан Т- І В-клітинної ланок імунітету коропів за ураження аеромонозом та асоційованою інфекцією аеромонозу з сапролегніозом. *«Молоді вчені у розв'язанні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини»: матеріали XIX Всеукр. наук.-практ. інтернет-конф., (м. Львів, 3-4 груд. 2020 р.). Львів, 2020. С. 104.*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	23
ВСТУП.....	24
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Загальна характеристика аеромонозу та сапролегніозу корошових риб. Асоційовані інфекції в рибництві.....	30
1.2. Пероксидні процеси й антиоксидантний захист в організмі риб: їх значення і фактори регуляції	35
1.3. Протеїни, фракційний склад та їх регуляція в організмі риб.....	38
1.4. Імунобіологічна реактивність організму коропів при інфекційних захворюваннях.....	40
1.5. Застосування у рибництві рослинних препаратів з профілактичною та лікувальною метою.....	46
1.6. Перспективи застосування пробіотичних і синбіотичних препаратів, як альтернатива антибактеріальним.....	49
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	
2.1. Методика та схеми проведення дослідів	53
2.2. Методи визначення біохімічних показників.....	60
2.3. Методи визначення імунологічних показників.....	65
2.4. Методи мікробіологічних досліджень.....	72
2.5. Методи статистичного аналізу.....	74
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	
3.1. Постановка діагнозу, коротка характеристика збудника.....	76
3.2. Стан системи антиоксидантного захисту й імунного потенціалу коропа, ураженого аеромонозом та сапролегніозом.....	85
3.2.1. Інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів та активність ензимів системи антиоксидантного захисту у гепатопанкреасі коропів, уражених аеромонозом та сапролегніозом.	85
3.2.2. Вплив аеромонозу та сапролегніозу на гематологічний профіль і стан гуморальної ланки природної резистентності організму коропів.....	88

3.2.3. Вплив аеромонозу асоційованого з сапролегніозом на кількість та функціональну активність Т- і В-лімфоцитів крові коропа.....	90
3.3. Стан антиоксидантного захисту й активність клітинної та гуморальної ланок імунітету коропа за впливу різних доз антибактеріального препарату «Флюмек».....	95
3.3.1. Активність ензимів системи антиоксидантного захисту й інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів у гепатопанкреасі коропа за дії різних доз препарату «Флюмек».....	95
3.3.2. Вплив антибактеріального препарату «Флюмек» на гематологічний профіль та активність клітинної і гуморальної ланок неспецифічної резистентності коропа.....	98
3.3.3. Кількість та функціональна активність Т- і В-лімфоцитів крові коропів за дії різних доз препарату «Флюмек».....	100
3.4. Вплив антибактеріального препарату «Флюмек» та його комплексу з насінням розторопші плямистої на активність імунного й антиоксидантного захисту у коропів, уражених аеромонозом.....	105
3.4.1. Вплив препарату «Флюмек» і його комплексу з насінням розторопші плямистої на вміст загального протеїну та співвідношення окремих його фракцій у крові коропів, уражених аеромонозом.	106
3.4.2. Рівень окиснювального пошкодження протеїнів, інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ензимів в організмі коропів, уражених аеромонозом та за лікування препаратом «Флюмек».....	108
3.4.3. Вплив препарату «Флюмек» і його комплексу з насінням розторопші плямистої на кількість та функціональну активність Т- і В-лімфоцитів крові коропів, уражених аеромонозом.....	113
3.4.4. Визначення антимікробної активності препарату «Флюмек».....	117
3.4.5. Застосування антибактеріального препарату «Флюмек» в умовах ставків.....	120

3.5. Стан імунного й антиоксидантного захисту у коропів, уражених аеромонозом, та за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін», активованого водним розчином йоду і селену124

3.5.1. Активність ензимів системи антиоксидантного захисту, інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів та рівень окиснювального пошкодження протеїнів у коропа за дії препарату «Ентеронормін».....124

3.5.2. Активність природних механізмів захисту організму коропа при застосуванні синбіотичного препарату «Ентеронормін».....126

3.5.3. Активність Т- і В-клітинної ланки специфічного захисту у коропа за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін».....129

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....135

ВИСНОВКИ.....150

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....153

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА.....154

ДОДАТКИ.....188

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АОС — антиоксидантна система

БАСК — бактерицидна активність сироватки крові

ГПЛ — гідропероксида ліпідів

ЕАС-РУЛ — розеткоутворюючі лімфоцити

Е-РУЛ — спонтанні розеткоутворюючі лімфоцити

ІРІ — імунорегуляторний індекс

КАТ — каталаза

ЛАСК — лізоцимна активність сироватки крові

ОМП — окисна модифікація протеїнів

ПОЛ — пероксидне окиснення ліпідів

СОД — супероксиддисмутаза

ТА-РУЛ — Т-лімфоцити активні

ТЕ-РУЛ — Т-лімфоцити загальні

Th — теофілінрезистентні лімфоцити (хелпери)

Ts — теофілінчутливі лімфоцити (супресори)

ФА — фагоцитарна активність

ФІ — фагоцитарний індекс

ФЧ — фагоцитарне число

ЦІК — циркулюючі імунні комплекси

ВСТУП

Актуальність теми. Хвороби риб наносять значні економічні збитки світовій аквакультури. Вивчення закономірностей їх виникнення та поширення, розробка заходів запобігання є важливою проблемою сучасного рибництва [1].

Аеромоноз корошових риб належить до одного з найпоширеніших захворювань ставкових риб, яке завдає значної шкоди рибництву. Загибель риби внаслідок цього захворювання становить 10–90 %. Виникнення аеромонозу може провокуватися стрес-факторами: рибоводні маніпуляції, різке підвищення температури, органічне забруднення водного середовища, зниження резистентності організму риб [32].

Сапролегніоз – захворювання риб та ікри, спричинене сапролегнієвими грибами (*Saprolegniales*), які є сапрофітами і постійно присутні у ґрунтах та воді водойм. Найчастіше сапролегніоз розвивається на тлі іншого захворювання чи в разі різкого зниження захисних функцій організму риб внаслідок погіршення умов вирощування [32].

У літературі наявні наукові праці, присвячені вивченню етіології, патогенезу, пошуку способів профілактики та лікування аеромонозу [6, 29, 90, 135]. Також існують відомості про вплив цього захворювання на окремі біохімічні показники крові [11, 91, 92, 132, 139, 285]. Водночас, залишаються недостатньо вивченими механізми функціонування імунної системи у корошів за аеромонозу [136, 156, 257]. При цьому наявні в літературі дані щодо асоційованої інфекції аеромонозу із сапролегніозом фрагментарні та обмежуються лише загальним описом захворювання [44, 45, 131, 146, 197]. Інформації щодо інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів, стану імунної й антиоксидантної систем захисту при асоційованій інфекції аеромонозу із сапролегніозом практично немає.

Слід зазначити, що на даний час у рибництві існує проблема в розробці ефективних препаратів, які можна було б застосовувати за аеромонозу. Лікарські засоби, які використовувалися часто заборонені для застосування

плавниковим риbam (Commission regulation (EU) No 37/2010), малоефективні або становлять небезпеку для здоров'я риб (левоміцетин та інші) [22].

З огляду на це актуальним є проведення досліджень, скерованих на вивчення біохімічного профілю крові, системи антиоксидантного захисту й імунного потенціалу у коропів, хворих асоційованим аеромонозом із сапролегніозом, та за умов застосування нових ефективних способів лікування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є складовою частиною досліджень, передбачених тематичним планом Інституту біології тварин за темою 35.00.02.12.ПШ «Дослідити вплив антибактеріального препарату на стан імунного та антиоксидантного статусу коропа (номер державної реєстрації 0118U003591, 2019 р.), а також Інституту рибного господарства НААН за темами 33.00.00.12П «Пошук нових засобів профілактики захворювань і лікування об'єктів риборозведення в умовах сучасної епізоотичної ситуації та розроблення способів їх практичного використання» (номер державної реєстрації 0116U001224, 2016–2018 рр.), 33.00.00.22П «Розробити способи застосування нових антигрибкових засобів у рибництві з урахуванням технологічних методів вирощування риби» (номер державної реєстрації 0119U100385, 2019–2020 рр.), у яких дисертантка була співвиконавцем і досліджувала процеси пероксидного окиснення ліпідів, стан імунного й антиоксидантного захисту, за ураження коропів аеромонозом і асоційованою інфекцією аеромонозу з сапролегніозом та за впливу антибактеріального препарату «Флюмек» як за окремого так і поєднаного його застосування з меленим насінням розторопші плямистої (*Silybum marianum*) та синбіотичного препарату «Ентеронормін».

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – визначити біохімічний профіль, активність імунної й антиоксидантної систем захисту у коропів за ураження аеромонозом та асоційованої інфекції аеромонозу з сапролегніозом. З'ясувати вплив антибактеріального та синбіотичного препаратів на активність вказаних систем у коропів, хворих аеромонозом.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- вивчити методи діагностики та провести ідентифікацію збудника аеромонозу корошових риб;
- дослідити гематологічний профіль, інтенсивність процесів ПОЛ, активність ензимів системи антиоксидантного захисту, стан клітинної і гуморальної ланок імунітету у корошов за ураження збудниками аеромонозу та асоційованої інфекції аеромонозу з сапролегніозом;
- визначити вплив різних доз нового антибактеріального препарату «Флюмек» на імунну функцію й антиоксидантний потенціал у клінічно здорових корошов;
- дослідити вплив антибактеріального препарату «Флюмек» за окремого та поєданого його застосування з меленим насінням розторопші плямистої (*Silybum marianum*) на стан системи антиоксидантного захисту (САЗ), активність природного й адаптивного імунітету у корошов, хворих аеромонозом;
- вивчити вплив синбіотичного препарату «Ентеронормін», активованого водним розчином йоду і селену, на вміст продуктів ПОЛ, активність ензимів САЗ, гематологічний профіль, стан клітинних і гуморальних факторів неспецифічної резистентності, кількість Т- і В-лімфоцитів та їх функціональну активність в уражених аеромонозом корошов;
- обґрунтувати, розробити та апробувати спосіб лікування аеромонозу корошов.

Об'єкт дослідження: аеромоноз корошових риб (збудник *Aeromonas hydrophila*), сапролегніоз (*Saprolegnia*), активність імунної й антиоксидантної систем захисту у корошов, уражених аеромонозом і сапролегніозом.

Предмет дослідження: показники ПОЛ, природного й адаптивного імунітету, гематологічного профілю, активність ензимів САЗ у корошових риб, уражених аеромонозом з нашаруванням вторинного захворювання – сапролегніозу, та за різних способів лікування.

Методи дослідження: біохімічні (спектрофотометрія – визначення ензиматичних активностей, вмісту субстратів і продуктів метаболічних реакцій); імунологічні (показники клітинної та гуморальної ланок імунної системи); бактеріологічні (виділення та ідентифікація збудників, визначення чутливості виділених патогенів до антимікробних препаратів); мікробіологічні (визначення бактеріального та грибового забруднення); клінічні (оцінювання стану організму риб); патолого-анатомічні; гематологічні (кількість еритроцитів та вміст гемоглобіну); статистичні (метод варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено комплексне дослідження і порівняльний аналіз біохімічних та імунологічних показників, що характеризують гематологічний профіль, стан природного й адаптивного імунітету, інтенсивність процесів ПОЛ, активність системи антиоксидантного захисту у корокових риб, уражених аеромонозом та асоційованою інфекцією аеромонозу з сапролегніозом. З'ясовано вплив антибактеріального та синбіотичного препаратів на активність вказаних систем у коропів, хворих аеромонозом.

Вперше експериментально досліджено антибактеріальний препарат «Флюмек» у рибництві, вивчено його вплив на біохімічний профіль, активність імунної й антиоксидантної систем як у здорових риб, так і уражених збудником аеромонозу. Запропоновано схеми застосування препарату «Флюмек» для лікування корокових риб за аеромонозу. Вперше експериментально досліджено ефективність застосування синбіотичного препарату «Ентеронормін», активованого водним розчином йоду і селену, у коропів за ураження збудником аеромонозу.

Наукову новизну одержаних результатів підтверджено деклараційним патентом України на корисну модель № 144100 «Спосіб лікування аеромонозу коропа» від 10.09.2020 р.

Практичне значення одержаних результатів. З'ясовано біохімічні та імунологічні зміни в організмі коропів, хворих на аеромоноз та асоційовану

інфекцію аеромонозу з сапролегніозом, що доповнюють існуючі відомості про патогенез цього захворювання.

На основі одержаних результатів запропоновано «Спосіб лікування аеромонозу коропа», який апробовано у рибогосподарствах Львівської області і рекомендовано до застосування. Апробовано новий антибактеріальний препарат «Флюмек» та синбіотичний препарат «Ентеронормін» і розроблено схеми їх застосування у рибництві.

Результати досліджень покладено в основу «Тимчасової настанови щодо застосування препарату «Флюмек» в рибництві» (*затверджено вченою радою Інституту рибного господарства НААН, протокол № 8 від 18 грудня 2018 р.*) та «Тимчасової настанови щодо застосування препарату «Ентеронормін» в рибництві» (*затверджено вченою радою Інституту рибного господарства НААН, протокол № 6 від 8 грудня 2020 р.*)

Отримані дані використовуються у навчальному процесі в Національному університеті біоресурсів і природокористування України та у Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького. Рекомендовано для включення у навчальні програми низки дисциплін на ветеринарних та біологічних факультетах вищих навчальних закладів третього і четвертого рівнів акредитації.

Особистий внесок здобувача. Автор самостійно проаналізувала наукову літературу з напряму досліджень; провела клінічні, іхтіопатологічні, гематологічні, бактеріологічні, патолого-анатомічні дослідження; прийняла участь у формуванні схеми проведення дослідів та вивчила дію препаратів «Флюмек» та «Ентеронормін» у лабораторних умовах та в умовах виробництва; провела статистичну обробку, узагальнила одержані результати. Окремі виробничі та лабораторні експерименти автором проведено спільно з науковцями, які є співавторами вказаних наукових публікацій. Аналіз результатів експериментальних досліджень, формулювання висновків та практичних рекомендацій проведено за участі наукового керівника.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались, обговорювались та отримали позитивну оцінку на: щорічних звітах Інституту біології тварин НААН у 2016–2019 рр., а також на міжнародних науково-практичних конференціях: «Досягнення та перспективи розвитку мікробіології» (Львів, 2016), «Актуальні проблеми ветеринарної медицини» (Київ, 2017), «Сучасні проблеми раціонального використання водних біоресурсів» (Київ, 2020), XV–XIX науково-практичних конференціях молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (Львів, 2016–2019 рр.), XVI, XIX Всеукраїнській науково-практичній інтернет-конференції «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (Львів, 2020).

Публікації. Основні положення дисертаційної роботи й отримані результати досліджень опубліковані у 15 наукових працях, у тому числі 6 статей у фахових наукових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз (2 – в журналах, 4 – у вісниках), 1 стаття одноосібна, патент на корисну модель, 8 тез у збірниках матеріалів наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел літератури. Дисертаційна робота викладена на 200 сторінках комп'ютерного тексту (основна частина – 129 сторінок). Робота містить 41 таблицю, 13 рисунків і 4 додатки. Список використаних джерел налічує 294 найменування, у тому числі – 196 латиницею.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика аеромонозу та сапролегніозу корошових риб. Асоційовані інфекції урибництва

Бактеріальні захворювання є причиною високої смертності як в диких, так і в риб, вирощених в аквакультури. Вони завдають значних економічних збитків рибництву [228]. Їх збудниками можуть бути як умовно патогенні бактерії, які викликають інфекційний процес в організмі риб лише за певних умов у разі зниження його резистентності, так і бактерії, що є облігатними патогенами для риб. Бактерії можуть бути не тільки етіологічним агентом основного інфекційного захворювання, а і ускладнювати перебіг інших хвороб, зокрема вірусних, інвазійних, аліментарних, викликаючи вторинні чи секундарні інфекції [32, 244].

Аеромонози – інфекційні хвороби риб бактеріальної природи. Збудник – вірулентні штами бактерій з роду *Aeromonas*, родини *Vibrionaceae* [6, 32]. Аеромонади – грамнегативні, короткі (1,2–1,8 х 0,6 мкм) палички з заокругленими кінцями, рухливі (мають один полярний джгутик), оксидазопозитивні факультативні аероби, які часто зустрічаються в довкіллі, виділяються від клінічно здорових риб та з води водойм [228, 244]. Серед них є як авірулентні, так і високовірулентні штами, які в біопробі викликають 100 % загибель риб. Аеромонози уражують більшість видів риб, зокрема коропа, сазана, їх гібриди (збудник – *Aeromonas hydrophila* та інші), лососевих (*A. salmonicida*), вугрів (*A. punctata* f. *saerovens*), більш стійкі – карасі, лин, рослиноїдні риби [13, 58, 123, 135, 182, 184].

Аеромоноз корошових – інфекційна хвороба, яка характеризується запаленням шкірного покриву, крововиливами, виразками, асцитом,

скуйовдженням луски, бактеріальною геморагічною септицемією, серозно-геморагічним дерматитом, екзофтальмом, глибоким некрозом м'язів, гідратацією м'язової тканини та всіх внутрішніх органів [74, 230, 244].

Збудник аеромонозу корокових – *Aeromonas hydrophila*, окрім традиційного для аквакультури України коропа (*Cyprinus carpio*) [91, 92, 95, 163], також виділяють в палії (*Salvelinus fontinalis*) [11, 13]; китайського карася (*Carassius auratus*) [177]; барбуса зеленого (*Puntius sarana*) [139]; паку (*Piaractus mesopotamicus*) [136]; білого амура (*Ctenopharyngodon idella*) [217]; товстолоба (*Hypophthalmichthys molitrix*) [95]; роху (*Labeo rohita*) [257]; тиляпії нільської (*Oreochromis niloticus*) [156, 241]; сома (*Clarias gariepinus*, *Schilbe mystus*, *Horabagrus brachysoma*) [70, 181, 285].

Сапролегніоз – захворювання риби та ікри, що викликаються представниками декількох родів сапролегнієвих грибів (*Saprolegniales*), які є сапрофітами і постійно присутні у ґрунтах та воді водойм. Найчастіше сапролегніоз розвивається на фоні іншого захворювання чи в разі різкого зниження захисних функцій організму риб внаслідок погіршення умов вирощування [170, 204, 205]. Сапролегніоз зустрічається не тільки в об'єктів аквакультури за різних технологій вирощування, у заводських умовах під час інкубації ікри, а і у риб та на ікрі у природних водоймах. Захворювання може бути довготривалим, особливо за низької температури у холодні пори року і викликати загибель риби. Сприяють розвитку сапролегніозу травмування, стрес, високі показники рН (вище 8,3), наявність органічного забруднення водойм [124, 228, 244].

Асоційовані інфекції (коінфекції) є дуже поширеними за своєю природою і виникають при ураженні господаря двома або більше генетично різними збудниками, де кожен збудник має патогенну дію і завдає шкоди господареві, чи зараження вторинними інфекціями, так що два або більше інфекційних агенти діють одночасно в одному організмі. Інколи асоційовані інфекції називають коінфекціями, рідше – полімікробні захворювання,

ускладнені інфекції, одночасні інфекції, змішані інфекції, множинні інфекції, подвійні інфекції, вторинні інфекції та суперінфекції [101, 112, 189, 250].

Дослідженню асоціативних інфекцій риб приділяють мало уваги, хоча такі інфекції поширені в природі [17, 43, 146, 147].

Коінфекції мають фундаментальний ефект і можуть змінювати перебіг та важкість різних захворювань риб. Взаємодії між двома патогенами можуть бути або синергетичними, або антагоністичними і можуть призвести до посилення або гальмування одного або обох збудників, посилення або зменшення важкості захворювання [43, 44, 45, 194].

Є дані про ураження коропів (*Cyprinus carpio*) асоціативним аеромонозом (*Aeromonas hydrophila*) і сапролегніозом (*Saprolegnia*) в скидних каналах електростанції в Росії [3]. Також було виділено аналогічну коінфекцію у риба аю (*Plecoglossus altivelis*) в Тайвані [131]; в морського окуня (*Dicentrarchus labrax*) при вирощуванні у рециркуляційних системах [146]; у сома (*Clarias gariepinus*) при вирощуванні у плавальних клітках [197].

У літературі наявні дані про те, що штучне зараження канального сома (*Ictalurus punctatus*) ентеробактерією *Edwardsiella ictaluri* викликає бактеріємію спричинену *Aeromonas hydrophila*, аналогічні результати отримані при зараженні в'єтнамського сома (*Pangasianodon hypophthalmus*) [138]. Є дані про одночасне інфікування смугастого сома (*Pangasianodon hypophthalmus*) двома збудниками – *E. ictaluri* та *Flavobacterium columnare* [147]; в атлантичного лосося (*Salmo salar*) виділяють одночасно дві бактерії – *Moritella viscosa* та *Aliivibrio wodanis* [166, 183]; в даніо репіо (*Danio rerio*) – *Aeromonas hydrophila* та *Aeromonas veronii* [130]; в китайського окуня (*Siniperca chuatsi*) – *Aeromonas hydrophila* та вірус ISKNV [201].

Окрім риб, є інформація про асоційовані інфекції у інших гідробіонтів, зокрема *Aeromonas hydrophila* з *Saprolegnia* одночасно виділено у прісноводних раків (*Astacus leptodactylus*) [111], а у рака вузькопалого (*Astacus leptodactylus*) – *Aeromonas hydrophila* та *Fusarium solani* [248].

Також в літературі наявні дані про супутні інфекції, котрі спричиняються двома або більше вірусними патогенами [112, 183, 184, 193].

Аеромноз риб може мати гостру, підгостру та хронічну форму перебігу. За гострого перебігу (асцитна форма) спостерігають масову загибель риби (до 90%), характеризується появою осередків крововиливів, куйовдженням луски, екзофтальмом, серозно-геморагічним запаленням шкірного покриву, а у дзеркальних коропів – утворенням під шкірою пухирів, наповнених прозорою чи кров'янистою рідиною (везикул), а також катарально-геморагічним запаленням кишкового тракту, гідратацією м'язової тканини та паренхіматозних органів, зміною їх консистенції та структури, накопиченням рідини в черевній порожнині (асцитом), збільшенням селезінки та зміною її кольору до темно-вишневого, розширенням кровоносних судин плавального міхура [110]. Для під гострого перебігу (асцитна-виразкова форма) є характерним скупчення рідини в черевній порожнині, утворення виразок на поверхневих покриттях, руйнування міжпроменевих перетинок плавців.

За хронічного перебігу (виразкова форма) спостерігається руйнування плавців, утворення виразок, гіперемія слизової оболонки кишечника, блідість печінки, збільшення жовчного міхура, набряк нирок [228]. Відомо, що при хронічному перебігу аеромнозу на початку захворювання різко збільшується відсоток нейтрофілів, що є важливим діагностичним показником. А в другій половині захворювання збільшується кількість моноцитів і поліморфноядерних лейкоцитів, при цьому знижується вміст нейтрофілів та гемоглобіну [6].

Досліджуючи особливості захворювань риб слід враховувати, що будь-яке захворювання супроводжується поєднанням двох протилежних процесів: патогенної дії на організм специфічного збудника чи інших етіологічних факторів та компенсаторно-приспосувальних процесів організму, спрямованих на відновлення порушених функцій органів та систем і збереження гомеостасу організму [122, 127].

Інфекційний збудник у разі проникнення у тканини та організми, зазвичай, викликає складну реакцію макроорганізму у вигляді різноманітних

запальних процесів. Запалення часто має обмежену локалізацію, проте впливає на організм загалом [176]. Бар'єрна функція запалення перешкоджає поширенню збудника з однієї локальної ділянки організму в іншу за рахунок фізико-хімічних змін в обміні речовин, кровопостачанні, кількісному співвідношенні та структурі формених елементів крові, вибірково змінюється проникність кровоносних судин, що носять захисний характер.

Запальні реакції у риб слабо вивчені, однак за проявами вони подібні на запалення у ссавців. Найчіткіше у риб проявляються почервоніння та набряки. Місцева та загальна температурні реакції виражені слабо, через віддачу тепла водному середовищу. Запалення у риб характеризується поєднанням трьох типів патологічного процесу: ушкодження тканин (альтерація), порушення кровообігу (гіперемія та ексудація) та проліферації клітин місцевих тканин. Ці процеси можуть перебігати не тільки послідовно, а і одночасно [188].

Ступінь альтеративного ураження тканин залежить від вірулентності збудника, важкості судинних розладів і стану захисних сил організму. Утворення виразок на шкірних покривах у риб пов'язують з судинними змінами. Судинні розлади у риб часто супроводжуються сильною транссудацією, ексудацією та еритродіapedезом. Це особливо характерно для багатьох гострих інфекційних захворювань, що протікають септично, зокрема й для аеромонозу. Вони проявляються почервонінням шкірних покривів, набряком пухкої клітковини (гідратацією м'язів, єрошінням луски, екзофтальмом), асцитом [271].

Для риб, в основному, характерне поєднання серозного та геморагічного запалення, фіброзний та гнійний тип запалення зустрічається вкрай рідко [270].

Якщо у ссавців гостре запалення супроводжує міграцією гранулоцитів, то у риб цей феномен виражений меншою мірою, що пов'язано з недостатньою кількістю і низькою фагоцитарною активністю нейтрофільних лейкоцитів риб. Важають, що вони виділяють в осередку запалення пероксиди, котрі беруть участь в окисненні та знешкодженні токсичних продуктів. Окрім

нейтрофілів, клітинний інфільтрат складається також з макрофагів, лімфоїдних елементів, плазмобластів [269].

Істотним компонентом запалення риб є розмноження клітинних елементів – проліферація, яка характеризується активним розмноженням клітин, переважно в сполучній тканині, внаслідок альтеративних та ексудативних процесів, що призводять до скупчення в осередку запалення значної кількості поживних речовин і біологічних стимуляторів. Проліферація особливо виражена при хронічних інфекціях (іхтіофоз, мікобактеріоз), а також при деяких інвазіях.

За інфекційних хвороб у риб частіше спостерігаються судинні зміни, порушення гемопоезу, які, переважно, мають загальний системний характер і виявляються у вигляді різних форм гіперемій, геморагій, анемій, локальних та поширених набряків і часто супроводжуються значним накопченням рідини. Це пояснюється особливостями анатомічної будови серцево-судинної системи, відсутністю у риб лімфовузлів [139].

Інтенсивність та характер запальних реакцій різний при бактеріальних та вірусних інфекціях риб, що пов'язано з різними факторами патогенності бактерій та вірусів. Патогенна дія бактерій, обумовлена їх інвазивністю і токсикогенністю, характеризується поєднанням кількох видів ексудативного запалення: серозного, серозно-геморагічного, фіброзного чи гнійного. При вірусних інфекціях патологія одразу починається з некробіозу і часто завершується некрозом тканин, оскільки віруси є облігатними внутрішньоклітинними паразитами [32].

1.2. Пероксидні процеси й антиоксидантний захист в організмі риб: їх значення і фактори регуляції

Молекулярний кисень є необхідною сполукою для всіх аеробних організмів, хоча кисень є потужним окисником, який може спричинити

оксидативний стрес (ОС). ОС виникає, коли існує дисбаланс між виробництвом окислювачів та антиоксидантів, є результатом нормального клітинного метаболізму, і багато з цих сполук відіграють фундаментальну роль у метаболічних шляхах [167]. Організм виробляє кілька активних форм кисню (АФК), але вони збалансовані антиоксидантною захисною системою, яка підтримує рівні цих окислювальних сполук на прийнятному рівні. Багато з цих компонентів є важливими для захисту організму, і їх побічні продукти вважаються потужними бактерицидами, які активно діють на знищення збудників інфекції [119].

У риб, як і у інших організмів, відсутність балансу між утворенням активних форм кисню (АФК) та антиоксидантною захисною системою (так званий окиснювальний стрес) може спричинити гідроксилювання ДНК, денатурацію протеїну, пероксидне окиснення ліпідів, апоптоз і зрештою пошкодження клітин [168, 172, 175].

У сучасній біології активація пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) розглядається як універсальна відповідь живої системи на дію екстремальних факторів [34, 104]. На інтенсивність ПОЛ в організмі риб впливають абіотичні (висока чи низька температура, гіпоксія чи гіпероксія, солоність води, гідростатичний тиск, міграція), біотичні (інфікування, інтоксикація продуктами метаболізму мікроорганізмів) та технологічні й екологічні (низька якість кормів, інтенсифікація рибництва та інтоксикація солями важких металів, фенолом, пестицидами) фактори [21].

Продукти ПОЛ є невід'ємною частиною здорового організму та сприяють підтриманню сталого біохімічного статусу клітин [62, 64]. Пероксидне окиснення ліпідів має важливе значення для оновлення біологічних мембран, ротації їх білкового й ліпідного компонентів, регуляції фізико-хімічних властивостей мембран клітин і субклітинних структур [48]. Посилення процесів пероксидного окиснення відіграє істотну роль у патогенезі багатьох захворювань [20, 152]. Порушення структури і складу ліпідного бішару мембран, викликані активізацією вільнорадикального окиснення, впливають на

зміну функціонування мембрани клітин, і, отже, систем, органів, тканин і організму риб в цілому. Стійкість мембран до вільнорадикального окиснення залежить від стану антиоксидантної системи [26].

Відомо, що у процесі еволюції в організмі риб виробилися спеціальні механізми захисту від деструктивної дії продуктів ПОЛ, які дістали назву антиоксидантної системи. Її роль полягає у регуляції інтенсивності утворення активних форм кисню (АФК) та знешкодженні продуктів ПОЛ [212].

Кисень у своєму молекулярному стані O_2 є важливим для багатьох обмінних процесів, життєво важливих для аеробного життя. Аеробні організми не можуть існувати без кисню, який, тим не менш, є за своєю суттю небезпечним для їхнього життя. Як і всі аеробні організми, риби також сприйнятливі до впливу реактивного кисню і мають ефективну систему антиоксидантного захисту [206, 212].

Системи антиоксидантного захисту у риб складається з ферментативної – глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, каталаза, супероксиддисмутаза та неферментативної ланки – вітаміни А, Е, С; мікроелементи Se, Fe, Cu, Zn, Co [158].

Активність антиоксидантних ензимів залежать не тільки від таксономічного положення видів риб, але й від екологічних умов утримання, сезону, захворювань [21, 42, 46, 60, 91, 104, 246]. Активність ензимів системи антиоксидантного захисту значно знижується при інфекційних та паразитарних хворобах риб [46, 91, 172, 181, 228, 285], а також під впливом певних речовин [168, 216, 274].

Питанням фармакологічної корекції розладів окиснювально-антиокиснювального гомеостазу у наш час приділяється дедалі більша увага дослідників. Надлишкову активацію вільнорадикальних процесів вважають універсальним механізмом ураження клітин при різних захворюваннях [5, 160].

Активні форми кисню викликають також окисну модифікацію протеїнів (ОМП) за умов норми та патології [119]. Підвищення ОМП є результатом порушення рівноваги між процесами, що регулюють синтез та оксидацію

протеїнів, і зменшення активності протеаз, які селективно розщеплюють окисдовані форми протеїнів. Однією з причин змін ОМП може бути неконтрольована інтенсифікація ПОЛ. Відомо, що продукти ПОЛ, реагуючи з лізиновими залишками протеїнів, спричиняють їх деградацію з утворенням різноманітних цитотоксичних сполук. Інтенсифікація ОМП може бути наслідком порушення функціонування захисних протирадикальних систем. В свою чергу, окиснювальній модифікації піддаються, насамперед, металоензими (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, цитохром Р-450) [53, 200, 289].

Таким чином, як ПОЛ так і ОМП є нормальними функціональними процесами в організмі, з якими пов'язані життєво важливі функції [27]. Причому, останні в значній мірі асоційовані з захисними та адаптаційними реакціями організму [172].

1.3. Протеїни, фракційний склад та їх регуляція в організмі риб

Плазма крові коропа, подібно до теплокровних тварин, містить низькомолекулярні протеїни, до яких належать преальбуміни, альбуміни, постальбуміни та трансферини, а також протеїни високомолекулярних фракцій, представлені фібриногеном, імунними глобулінами, гліко-та ліпопротеїнами. У коропа в плазмі крові виявлені також протеїни з молекулярною масою 80–140 кДа, до яких належать церулоплазмін, гаптоглобін та низка інших глобулярних протеїнів. Основними ж протеїнами плазми крові коропових риб залишаються фракції альбумінів та глобулінів [41, 196]. Протеїни сироватки крові є досить лабільною метаболічною системою, що відображає адаптивні зміни в організмі, які відбуваються під впливом внутрішніх та зовнішніх факторів [27].

Відомо, що протеїни крові визначають транспортні, захисні функції, беруть участь у регуляції кислотно-лужного стану організму, є також антитілами і регуляторами згортання крові. Тому їх вміст у крові виступає

досить важливим діагностичним параметром у ряді захворювань, які особливо пов'язані з порушенням метаболізму. Альбуміни відіграють істотну роль у підтриманні колоїдно-осмотичного тиску крові, а також служать для організму важливим джерелом амінокислот. Крім того, з альбумінами пов'язують транспорт ряду як низько-, так і високомолекулярних речовин амінокислот, жирних кислот, вітамінів, гормонів, а також катіонів та токсинів. Фракція γ -глобулінів складається з імуноглобулінів, які функціонально є антитілами, що забезпечують гуморальний імунітет [93]. Вміст та співвідношення фракцій протеїнів сироватки крові є видоспецифічними. Зміна загального вмісту протеїнів та їх фракційного складу сироватки крові риб залежить від сезону, віку та фізіологічного стану організму [9]. Завдяки моніторингу рівня вмісту загального протеїну в сироватці крові можливе отримання найбільш точних даних про імунний статус коропа [196]

В літературі наявні дані про те, що антибактеріальний препарат, а саме – сульфаніламід, змінював загальний вміст та фракційний склад протеїнів плазми крові дворічок коропа, знижуючи рівень протеїнів високо-та низькомолекулярних фракцій, викликаючи появу додаткових та зникнення окремих білкових зон з молекулярною масою близько 100–140 кДа та 35 і 50 кДа відповідно, попри сталі значення загального вмісту протеїнів [41]. У сироватці крові риб, яким вводили препарати, що володіють антиоксидантними властивостями, зафіксовано зменшення вмісту альбумінів за рахунок збільшення вмісту α - і γ 2-глобулінів [19]. У риб за ураження асоційованою паразитарною інвазією пригнічується протеїн-синтезувальна функція гепатопанкреасу, а саме – знижується рівень загального протеїну та його фракцій у сироватці крові [93]. В коропів, хворих краснухою, вміст загального протеїну знижується [92].

Мазур Т. В., Гаркуша І. Є. (2016) повідомляють, що застосування пробіотичного комплексу, позитивно впливає на вміст у крові загального протеїну та його фракцій у сироватці крові коропів, зокрема ними констатовано зменшення концентрації альбуміну та зростання рівня γ -глобулінів.

1.4. Імунобіологічна реактивність організму коропів, при інфекційних захворюваннях

У риб спостерігається залежність різних проявів імунологічної реактивності від абіотичних чинників зовнішнього середовища, в першу чергу від температури та екологічних особливостей виду, що принципово відрізняє їх від теплокровних [32].

Отже, найбільш важливі механізми імунітету у риб, які виявлені на сьогодні, є механізм виділення (коли за певних температур сторонні речовини, що потрапляють у кров, поступово виводяться з організму через органи виділення); фагоцитоз (активність якого зростає з підвищенням температури води та в імунізованих рибах); бакерицидність тканин та органів (зумовлена наявністю біологічно активних речовин – лізоциму, системи комплементу, пропердину); здатність продукувати інтерферон (антивірусний білок); здатність продукувати антитіла у відповідь на антигенне подразнення [17].

Наприклад, за температури води нижче 10°C у риб переважає дія механізмів виділення та бактерицидність тканин і органів, а у разі підвищення температури активізується фагоцитоз та утворення антитіл. Роль температурного чинника у визначенні напруги вродженого імунітету, а отже і рівня сприйнятливості чи стійкості до хвороби, обґрунтовує чітко виражену сезонність епізоотії інфекційних та інвазійних хвороб.

На імунологічну реактивність організму риб впливає і фактор вгодованості. За згодовування якісного, збалансованого корму імунологічна реактивність вгодованих риб вища [120]. Сприйнятливість риб до окремих захворювань залежить також від їх віку [167].

Для риб характерні безліч неспецифічних та специфічних, гуморальних та клітинних механізмів протистояння бактеріальним захворюванням [164, 195].

До неспецифічних факторів захисту в риб відносять: епітеліальні та ендотеліальні покриття органів; слиз на шкірі, зябрах і травному тракті; високу регенераційну здатність тканин; вміст великої кількості лейкоцитів у крові; добре розвинена система моноклеарних фагоцитів, представлена розкиданими по всьому організму клітинами ретикулярної, лімфоїдної, ендотеліальної тканин; гуморальні та фізіологічні реакції організму [253]. Зовнішні покриття тіла риб разом із слизом, що вони виділяють вкочують не лише функцію механічного захисту. Слиз риб містить муциноподібні речовини, лізоцим, бактеріолізину, пропердин, секреторні імуноглобуліни та інші речовини, що забезпечують його нейтралізуючі, кровоспинні, антимікробні та антипаразитарні властивості [156]. За тривалої дії екзогенних подразників (токсинів, зміни рН води та ін.) настає виснаження скреції слизу, змінюються його захисні властивості, що призводить до зниження бар'єрних властивостей шкіри, її травмування, що сприяє проникненню в організм мікробів, паразитів чи хімічних речовин.

До неспецифічних гуморальних факторів належать інгібуючі ріст речовини, наприклад трансферин та антипротеази; лізини, наприклад лізоцим, С-реактивний білок (СРБ), бактерицидні пептиди і, що найважливіше, комплемент, який має літичну, прозапальну, хемотаксичну активність, таким чином створюючи зв'язок з неспецифічними реакціями фагоцитів, які переважно виконуються нейтрофілами та макрофагами. Фагоцити містять багато гідролітичних ферментів і при стимулюванні бактеріями виробляють активні форми кисню (АФК), особливо гідроксильний радикал, через утворення супероксидних аніонів та оксиду азоту [103, 109, 133, 150].

Нижні хребетні, такі як риби, здебільшого залежать від вродженого імунітету, як першої лінії захисту від вторгнення патогенів [192]. Одним із захисних механізмів вродженого імунітету для риб є використання фагоцитарних клітин, таких як моноцити, макрофаги, нейтрофіли, тучні клітини та дендритні клітини для боротьби із патогенами. Деякі фагоцитарні клітини відіграють додаткову роль, слугуючи мостом між вродженим та

адаптивним імунітетом у риб [201]. Останні дані показали, що активність клітин фагоцитів у риб може посилюватися природною або хімічною речовиною (імуностимуляторами), яка стимулює імунну систему, головним чином для посилення механізмів імунної відповіді [100]. Фагоцитоз – це вроджений процес захисту, який взаємопов’язує ці дві системи, оскільки переробка патогенних мікроорганізмів фагоцитами є фундаментальним етапом для виробництва антитіл. Під час фагоцитозу відбувається вироблення АФК і, як наслідок, вироблення вільних радикалів, ці сполуки призводять до утворення потужних бактерицидів для боротьби з мікроорганізмами. Однак відомо, що оксидативний стрес обмежує імунну відповідь, погіршуючи захисні реакції, намагаючись зменшити вироблення АФК [2].

Є дані, що при експериментальному введенні рибам *Enterococcus sp.* – збільшення кількості лейкоцитів та лімфоцитів супроводжувалось зменшенням кількості моноцитів, а відсоток фагоцитарної активності в крові зростає після зараження [213]. Відомо, що фагоцитарні показники суттєво зростають при інфекційному захворюванні риб – вібріозі з слабким та сильним ступенем інфікування, а потім знижуються при погіршенні стану хворих риб.

Прикріплення мікроорганізму до поверхні фагоцита (адгезія) відбувається шляхом механізму розпізнавання за рахунок взаємодії вуглеводних залишків. Одна клітина нейтрофілу здатна поглинати десятки корпускулярних тіл. Нейтрофіл продукує активні сполуки кисню – гідрогену пероксид (H_2O_2), супероксидних радикал, які проявляють руйнівну дію на клітинні мембрани бактерій, а лізосомні ферменти нейтрофілів лізують їх клітини [210]. Фагоцитоз може бути завершеним, коли збудник перетравлюється у фагосомі, або незавершеним, коли збудник у ній лише ізолюється, але зберігає життєздатність і навіть в подальшому може розмножуватися [221]. Цей захисний механізм нестійкий, і за певних умов, що негативно впливають на макроорганізм, знижуючи його резистентність, мікроорганізми, що зберегли життєздатність, можуть викликати загострення захворювання. В риб у певних умовах спостерігають фагоцитоз і у еритроцитів,

тромбоцитів, клітин ретикуло-ендотеліальної системи, деяких клітин слизової оболонки шлунково-кишкового тракту [157, 242].

Що стосується механізмів специфічної імунної відповіді для риб характерні, як загальні закономірності, так і низка особливостей [190].

Відомо, що функцію розпізнавання та сприйняття мікробів в організмі риб виконують лімфоцити, як мають гетерогенні антигенреагуючі рецептори. Цей процес стимулює появу в місці локалізації антигенів ефektorних клітин: макрофагів, плазмобластів, плазматичних клітин та гранулоцитів, які переводять антиген в імуногенну форму [238]. Вважають, що появі антитіл в крові передуює диференціація лімфоїдних клітин селезінки, головної і середньої нирки в сторону плазмобластів [243]. Морфологічно це проявляється проліферацією клітин ретикулоендотеліальної системи, гіперплазією гемопоетичних тканин та супроводжується збільшенням об'єму селезінки та нирок [236].

Особливістю антитіл та рецепторів є наявність в їх молекулі ділянок, які чітко відповідають певним ділянкам у молекулі антигену, що забезпечує їх взаємодію та інактивацію антигену. Елімінація антигену при взаємодії з антитілом відбувається шляхом нейтралізації (віруси, токсини), аглютинації (бактерії) і преципітації (розчинні антигени), що в свою чергу посилює реакцію фагоцитозу за рахунок швидкого розпізнавання чужорідних частинок і активізує систему комплементу [245]. За своїм походженням антитіла можна поділити на природні та набуті. Природні антитіла утворюються за дії незначної кількості антигенного подразника, що не викликає інфекційного процесу (субклінічна інфекція). До набутих антитіл належать імуноглобуліни, які з'являються в організмі риб як результат перенесення відповідного інфекційного захворювання або у відповідь на потрапляння різних за своєю структурою і природою антигенів [32].

Система комплементу є найважливішим фактором резистентності організму в умовах як вродженого так і набутого імунітету. Це складний комплекс протеїнів (близько 20) каскадної системи, що формує швидку посилену відповідь на проникнення антигену. При цьому продукт однієї реакції

слугує каталізатором подальшої [224]. Системі комплементу властива попередня взаємодія з чужорідною клітиною перед фагоцитозом (опосонізація); цитотоксична дія на антигени клітинного типу (цитоліз); активація клітин імунної системи та залучення фагоцитів у вогнище запалення; нейтралізація антигенів і подальше їх вилучення з організму [207].

У риб встановлено наявність Т- і В-лімфоцитів, при цьому в нирках коропа лімфоцити являють собою змішану популяцію, а в селезінці – однорідну популяцію, що складається з аналогів В-клітин [208]. В пронефросі форелі трапляються лише аналоги В-лімфоцитів, а в селезінці – Т- і В-клітини. Під дією специфічної антигенної інформації в лімфоїдних органах риб (нирках, селезінці, тимусі) синтезуються антитіла, що відносять до класу Ig М- подібних імуноглобулінів ссавців [218].

Динаміка антитілогенезу в риб подібна до утворення антитіл у теплокровних, за виключенням того, що вона залежить від температури води. Відомо, що максимальне утворення антитіл відбувається у період найбільшої фізіологічної активності риб, тобто при температурі, оптимальній для росту і розвитку даного виду.

Епізоотологічні спостереження за перебігом заразних захворювань риб та дослідження встановили, що після захворювання у риб формується набутий імунітет. Так, поява імунітету за аеромонозу, дозволяє розкрити певні епізоотологічні особливості перебігу цього захворювання в ізольованому та не ізольованому стаді коропів. У першому випадку формується імунна група риб, за рахунок чого інфекція поступово згасає. В другому – при поповненні стада новими рибами, зауважують загострення захворювання, що може тривати значний період часу [176].

Здатність до вироблення антитіл становить специфічний гуморальний захист, пригнічуючи приєднання бактерій або інвазію нефагоцитарних клітин-господарів та нейтралізуючи бактеріальні токсини [110, 209]. Антитіла можуть діяти як опсоніни і здатні лізувати бактеріальну клітину, активувати запалення, приплив фагоцитів і ще більше посилювати фагоцитоз [118]. Бактерицидна

активність макрофагів може помітно підвищуватися цитокінами, що виділяються Т-лімфоцитами при контакті з їх специфічним антигеном [122, 132, 149, 151].

Відомо, що у ссавців Т-клітини відіграють центральну роль в адаптаційній імунній відповіді, і підгрупи Т-клітин виконують певні функції, що беруть участь як у гуморальній, так і в опосередкованій клітинами імунній відповіді. У риб подібні функції Т-клітин, відомих для ссавців, були зареєстровані в експериментах *in vivo* та *in vitro*, наприклад, Th-клітини допомагають іншим клітинам, таким як В-клітини та макрофаги, Т-кіллери вбивають заражені вірусом клітини і трансплантовані алогенні клітини та тканини [196, 222, 223, 225, 265].

Т-кіллери (Т-цитотоксичні клітини, CD8⁺) відіграють ключову роль у знищенні вірусів у адаптаційній імунній системі ссавців. Багато недавніх досліджень щодо Т-клітинного імунітету риб свідчать про те, що у костистих риб цитотоксичні Т-клітини також важливі за противірусного імунітету [258, 267, 268]. Th-клітини, відіграють важливу роль в організації адаптивних імунних реакцій на різні інфекційні агенти [266, 273].

Крім того, повідомляється про важливу роль опосередкованого клітинами імунітету, а не лише гуморального імунітету в захисті від внутрішньоклітинної бактеріальної інфекції. Є інформація про пряму антибактеріальну активність Т-кілерів (CD8α⁺) і Т-хелперів (Th-PUЛ, CD4⁺) клітин у риб [226, 273]. Також дослідили пряму антибактеріальну активність лімфоцитів у імунізованих риб, та виявили, що сенсibilізовані та не сенсibilізовані лімфоцити неспецифічно вбивали бактерії-мішені без необхідності контакту [264].

Повідомляють про те, що як клітинно-опосередкований, так і вроджений імунітет, а не гуморальний імунітет відіграють важливу роль у захисті від внутрішньоклітинної бактеріальної інфекції (*Edwardsiella tarda*) [282].

Механізм дії Т-кілерів проти внутрішньоклітинних патогенів включає обмеження МНС (Major Histocompatibility Complex) та антиген-специфічне

розпізнавання та зв'язування інфікованих клітин господаря. Окрім цього, нещодавні дослідження на ссавцях показали, що Т-кілери можуть виявляти пряму антимікробну активність і здатні знищувати різні типи патогенів, включаючи бактерії, паразитів та гриби [107, 264].

Аналіз літературних даних показав, що корофи на дію бактеріальної культури *A. hydrophila* реагують зниженням величин індексів імунокомпетентних органів, котрі відображають потенційні можливості імунної системи риб щодо синтезу специфічних антитіл до збудника захворювання, а також нейтралізації чужорідних тіл, що підтверджує негативний вплив даних збудників на організм риб в цілому, та на імунну систему зокрема [72].

1.5. Застосування у рибництві рослинних препаратів з профілактичною та лікувальною метою

Традиційно для лікування та профілактики захворювань риб використовуються різні хіміотерапевтичні засоби, котрі мають швидкий терапевтичний ефект, однак неправильне та постійне використання антибіотиків може призвести до потенційного розвитку стійких до антибіотиків бактерій, забруднення навколишнього середовища та накопичення токсичних залишків у рибі [117, 145, 148].

На сьогодні, з метою підвищення приростів і для боротьби з патогенними мікроорганізмами, у рибництві пропонують використання препаратів рослинного походження [163, 171, 173]. Альтернативні дієтичні добавки – підвищують ефективність росту, здоров'я та імунну систему риб, а також ці продукти недорогі, безпечні, ефективні, їх можна легко приготувати та вони мають здатність біорозкладатися [145].

У нільської тилапії, яку годували сумішшю екстрактів астрагалу та японської жимолості, зареєстровано збільшення фагоцитарної та лізоцимної активності в плазмі; ці риби також показали підвищену виживаність порівняно з контролем за експериментального зараження *A. hydrophila* [109].

Трави астрагал перепончатий (*Angelica membranaceus*) і дудник китайський (*A. sinensis*) використовуються для зміцнення імунної системи коропа, великого жовтого крока (Jian & Wu 2003, 2004), райдужної форелі (Dey & Chandra 1995) та тилапії (Dugenci та ін., 2003). Додавання етанолового екстракту зеленого чаю до раціону чорного морського окуня (*Sebastes melanops*) підвищило лізоцимну активність, а також знизило рівень загального холестерину [171].

В Україні також використовують рослинні препарати в рибистві [24, 66], в тому числі і розторопшу плямисту [35, 61].

У плодах розторопші плямистої містяться флавоноїди і флавоногліни (силібін, силікрістин, силідіанін та ін.), крім того, алкалоїди, сапоніни, слиз, органічні кислоти, вітамін К, гіркоти, жирна олія (16–28 %), протеїнові та інші речовини [62, 65].

Насіння розторопші плямистої, містить рідкісну біологічно активну речовину силімарин, яка включає в себе три ізомери: силібін, силідіанін, силіхрістин. Саме завдяки вмісту силімарину розторопші властивий винятковий лікувальний ефект [62, 105]. Розторопша володіє гепатопротекторними, протизапальними, імуномодуючими, антиоксидантними та інші властивості [23, 35, 105, 107, 165]. Розторопша плямиста профілактично захищає непошкоджені гепатоцити і підвищує їхню стійкість до інфекції [165, 235].

В літературі наявні дані про те, що додавання до комбікормів коропів меленого насіння розторопші плямистої сприяє зростанню кількості еритроцитів, гемоглобіну, активації антиоксидантних ензимів та зниженню інтенсивності процесів ПОЛ; також констатовано вищий потенціал природних факторів захисту в організмі коропів [36, 37].

Введення розторопші, як кормової добавки, цюголіткам тилапії сприяло зростанню загальної концентрації протеїну в крові, а також вмісту альбумінів та глобулінів, підвищенню активності СОД та каталази [165].

При згодовуванні райдужній форелі (*Oncorhynchus mykiss*) біологічно активної речовини силімарину, що входить до складу розторопші, встановлено

збільшення гематокриту, кількості еритроцитів, вмісту гемоглобіну, а також зростання вмісту протеїнів у плазмі крові, підвищення рівня альбуміну та глобуліну [105]. Отже, розторопша плямиста впливає на функції органів кровотворення, які відіграють важливу роль у формуванні клітин крові. При цьому також встановлено значне збільшення активності лізоциму у плазмі крові риб, що вказує на підвищення захисних механізмів проти бактерійних агентів [105].

В літературних джерелах наявна інформація про те, що у коропів, яким вводили бактерії *Aeromonas hydrophila*, та згодовували при цьому розторопшу, вміст загального протеїну, рівень IgM та активність лізоциму в сироватці крові зростали, у порівнянні з рибами, яким вводили бактерії *Aeromonas hydrophila* без додавання до раціону розторопші. При цьому бактерицидна активність зростала лише у риб, яким не вводили *Aeromonas hydrophila*, але згодовували розторопшу. Тому автори даного дослідження стверджують, що пероральне введення розторопші підсилює деякі неспецифічні імунні реакції у коропів, і його можна рекомендувати як рослинний імуностимулятор у риб [107].

Пероральне введення силімарину риbam суттєво знижує рівень глюкози та холестерину в плазмі крові та підвищує вміст загального протеїну та глобулінів. Підвищення рівня альбуміну в плазмі крові вказує на важливу роль його в транспортуванні лікарських речовин у кровоносну систему риб. Силімарин також стабілізував структуру клітинної мембрани та регулював активність аланінамінотрансферази й аспартатамінотрансферази. При цьому автори вказують, що пероральне введення силімарину до 400 мг на 1 кг корму не має побічного ефекту на біохімічні та клінічні показники крові риб, однак пероральне введення 800 мг/кг силімарину спричинило цитотоксичність та зміни біохімічних показників крові риб [116].

1.6. Перспективи застосування пробіотичних та синбіотичних препаратів, як альтернатива антибактеріальним

На сучасному етапі розвитку тваринництва і комбікормової промисловості все частіше застосовують такі альтернативи антибіотикам як: пробіотики, пребіотики, синбіотики, фітобіотики, натуральні стимулятори росту, імуностимулятори, специфічні ферментні препарати, підкислювачі [29, 125, 128, 142, 143, 144].

Пробіотики – препарати біологічної дії на основі корисних мікроорганізмів та/або їх метаболітів, які не завдають шкоди організму тварин і дозволяють виробляти безпечні харчові продукти. Вважається, що основний механізм дії пробіотиків полягає у нормалізації складу та біологічної мікрофлори шлунково-кишкового тракту, тобто його заселенні конкурентоспроможними штамами бактерій-пробіонтів, які здійснюють неспецифічний контроль над чисельністю умовно-патогенної мікрофлори шляхом витіснення її з кишкового біоценозу [59, 174, 232, 233, 240, 247, 281].

Кормові пребіотики – компоненти у виді речовини або комплексу (ди-, трисахариди, оліго-, полісахариди, жирні ненасичені кислоти, ферментні комплекси, екстракти), які забезпечують оптимізацію мікроекологічного статусу організму тварини за рахунок вибіркової стимуляції росту або біологічної активності нормальної мікрофлори травного тракту [230].

Синбіотики – комбінація кормових пробіотиків і пребіотиків, яка підсилює фізіологічні функції та метаболізм в організмі в наслідок ефекту синергізму [99, 129, 214].

Одним із шляхів вдосконалення технологій вирощування і розведення риб і підтримки нормального фізіологічного статусу є застосування пробіотичних мікроорганізмів [106, 174, 215, 233]. Культури, що входять до їх складу можуть продукувати різні активні речовини, утилізувати шкідливі продукти обміну, надавати антагоністичний вплив на патогенні мікроорганізми. Так само відомо що застосування пробіотиків впливає на клітинний і

біохімічний склад крові [49, 24]. З огляду на це значне наукове і практичне зацікавлення становить вивчення впливу різних пробіотичних препаратів, які можна застосовувати як для лікування, так і для профілактики інфекційних хвороб у риб. У світовій практиці накопичений значний досвід щодо підвищення антибактеріальної резистентності риб і підтримці високих темпів зростання за допомогою пробіотиків і вакцин [128, 140, 242, 256, 272, 281].

Для поліпшення антиоксидантної захисної здатності застосовувались різні підходи, такі як введення синтетичних антиоксидантів. Протягом останніх років дієтичні підходи пропонувались як перспективний спосіб підвищення антиоксидантної захисної активності у різних видів риб та моллюсків. Серед них мікробні кормові добавки (включаючи пре-, про- та синбіотики) показали вплив на активність антиоксидантних ензимів [168].

При введенні пробіотику на основі різних штамів *Lactobacillus* та *Pediococcus* малькам сазана, котрі попередньо були експериментально заражені *Aeromonas punctata*, відзначено відсутність фізіологічних порушень та загибелі риб [8]. При вирощуванні різновікових груп каналного сома (*Ictalurus punctatus* Rafinesque) з використанням пробіотичних кормових добавок NUPRO® та BIO-MOS® підвищується інтенсивність росту риб та зменшуються витрати кормів [12]. Застосування експериментального пробіотику на основі *Bacillus subtilis* та *Lactobacillus acidophilus* дало позитивні результати у кількісних змінах показників крові однорічок коропа [49]. Використання пробіотику «Біфітріл» з профілактичною метою забезпечує зменшення на 90 % захворювання коропів на аеромоноз в експериментальних умовах [90].

Введення *Pediococcus acidilactici* та коротколанцюгових фруктоолігосахаридів (scFOS) атлантичному лососю (*Salmo salar* L.) має захисну дію на клітини слизової оболонки кишечника, покращуючи морфологію та стимулюючи вроджену імунну відповідь, і не впливає негативно на продуктивність росту та перетравлення кормів [99]. Дієтична добавка *B. subtilis* покращила ріст, коефіцієнт ефективності кормів, неспецифічні імунні

реакції та стійкість до хвороб у мальків великого жовтого горбиля (*Larimichthys crocea*) [106].

У літературі наявні дані щодо високої антимікробної активності молочнокислих бактерій, призначених для використання в якості пробіотиків в аквакультури [220]. Також при застосуванні молочнокислих бактерій та деяких *Bacillus spp.* у шлунково-кишковому тракті, відбувається вироблення інгібуючих сполук, конкуренція з потенційними патогенами, пригнічення експресії гена вірулентності, посилення імунної відповіді, покращення морфологія шлунка та сприяння функції травної системи риб [99].

Дослідження вказують, що згодовування синбіотиків збільшує рівень глюкози, загального протеїну та загального рівня холестерину, а також констатовано значно вищу активність лізоциму, при цьому знизилась загальна смертність у риб [255].

Введення комплексного синбіотичного препарату сприяє зростанню гематокриту крові, гемоглобіну, еритроцитів, лейкоцитів, загального протеїну та підвищувало активність антиоксидантних ензимів (СОД, каталази), знижувало рівень продуктів ПОЛ, при цьому збільшувався рівень IgM, лізоцимної, бактерицидної та фагоцитарної активності крові у тилапії [141].

Є дані, що штами *Bacillus subtilis* мають потенціал для запобігання захворюванню спричиненому *A. hydrophila*, оскільки застосування даних штамів знижує захворюваність та загальну смертність при експериментальному зараженні бактеріями [102].

Висновки до розділу.

Аналіз наявної літератури вказує про те, що наявна база наукових праць присвячених вивченню етіології, патогенезу, пошуку способів профілактики та лікування аеромонозу. Також наявні у літературі дані про вплив захворювання на систему антиоксидантного захисту, процеси пероксидного окиснення ліпідів, білковий профіль крові. При цьому представлені у літературі дані щодо асоційованої інфекції аеромонозу із сапролегніозом фрагментарні та

обмежуються лише загальним описом захворювання. Інформації щодо динаміки пероксидних процесів, стану імунної й антиоксидантної систем захисту при асоційованій інфекції аеромонозу із сапролегніозом практично немає.

Слід зазначити, що на даний час у рибництві існує проблема в розробці ефективних препаратів, які можна було б застосовувати за аеромонозу. Лікарські засоби, які використовувалися часто заборонені для застосування плавниковим риbam, малоефективні або становлять небезпеку для здоров'я риб (левоміцетин та інші).

З огляду на це актуальним є проведення досліджень, скерованих на вивчення біохімічного профілю крові, системи антиоксидантного захисту й імунного потенціалу у коропів, хворих асоційованим аеромонозом із сапролегніозом, та за умов застосування нових ефективних і безпечних способів лікування.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Методика та схеми проведення дослідів

Дисертаційна робота виконана в лабораторії імунології Інституту біології тварин НААН. Експериментальну частину роботи проведено на базі Львівської дослідної станції Інституту рибного господарства НААН упродовж 2016–2019 рр.

Експериментальну частину роботи виконували у три етапи. Загальна схема досліджень представлена на рис. 2.1.

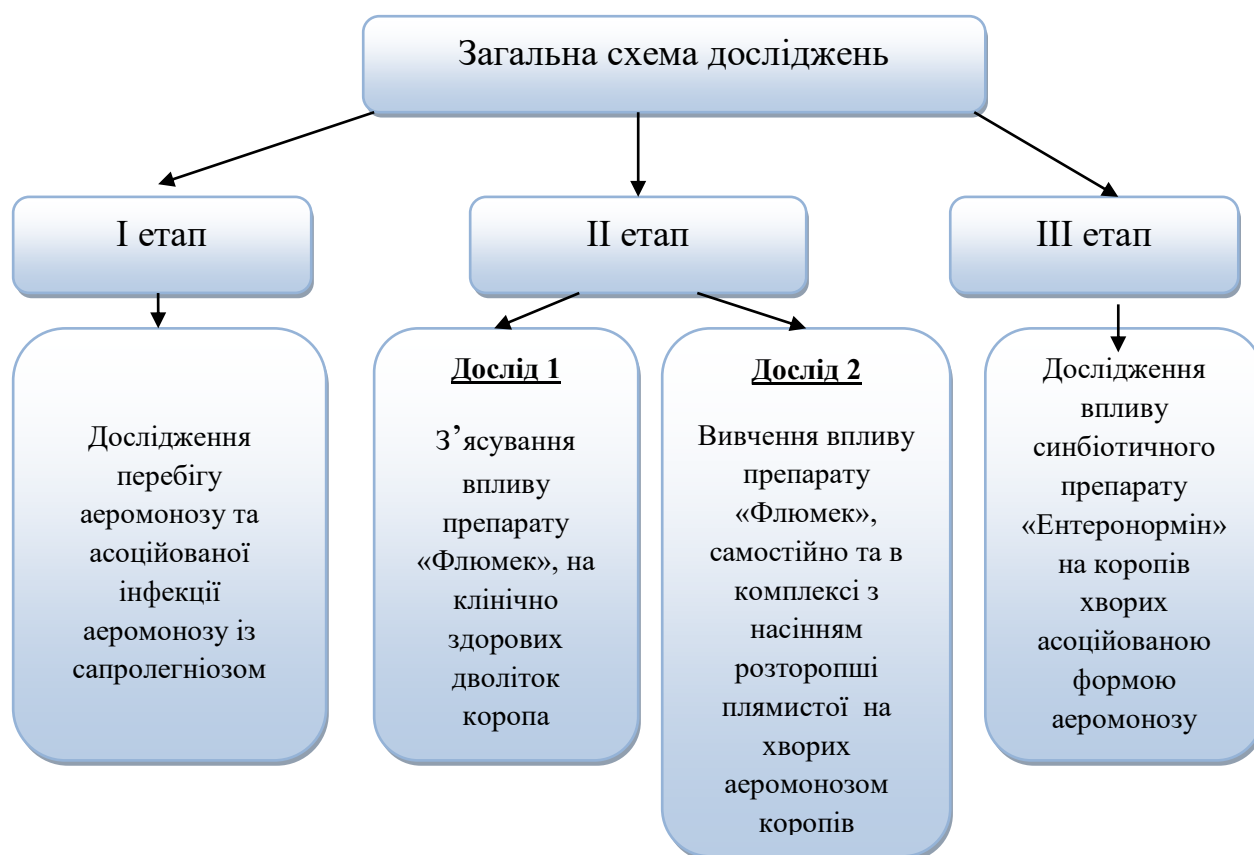


Рис. 2.1. Загальна схема досліджень

Мета першого етапу досліджень полягала у з'ясуванні інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів, активності системи імунного й

антиоксидантного захисту в організмі коропів, хворих на аеромоноз та асоційовану інфекцію аеромонозу з сапролегніозом. Дослідження проводилися на 3-х групах дволіток коропа по 10 особин у кожній, середньою масою $316,03 \pm 17,81$ г та довжиною $23,58 \pm 0,55$ см. Контрольна група, яку становили клінічно здорові риби, перша дослідна група (Д1) – коропи хворі на аеромоноз, друга дослідна група (Д2) – коропи хворі асоційованою інфекцією – аеромонозом з сапролегніозом. Матеріалом для дослідження слугувала кров, яку брали із серця риб за допомогою піпетки Пастера, попередньо застосовували наркоз з використанням ефірної олії гвоздики (*Oleum Caryophylli*) [227] та зразки тканин гепатопанкреасу.

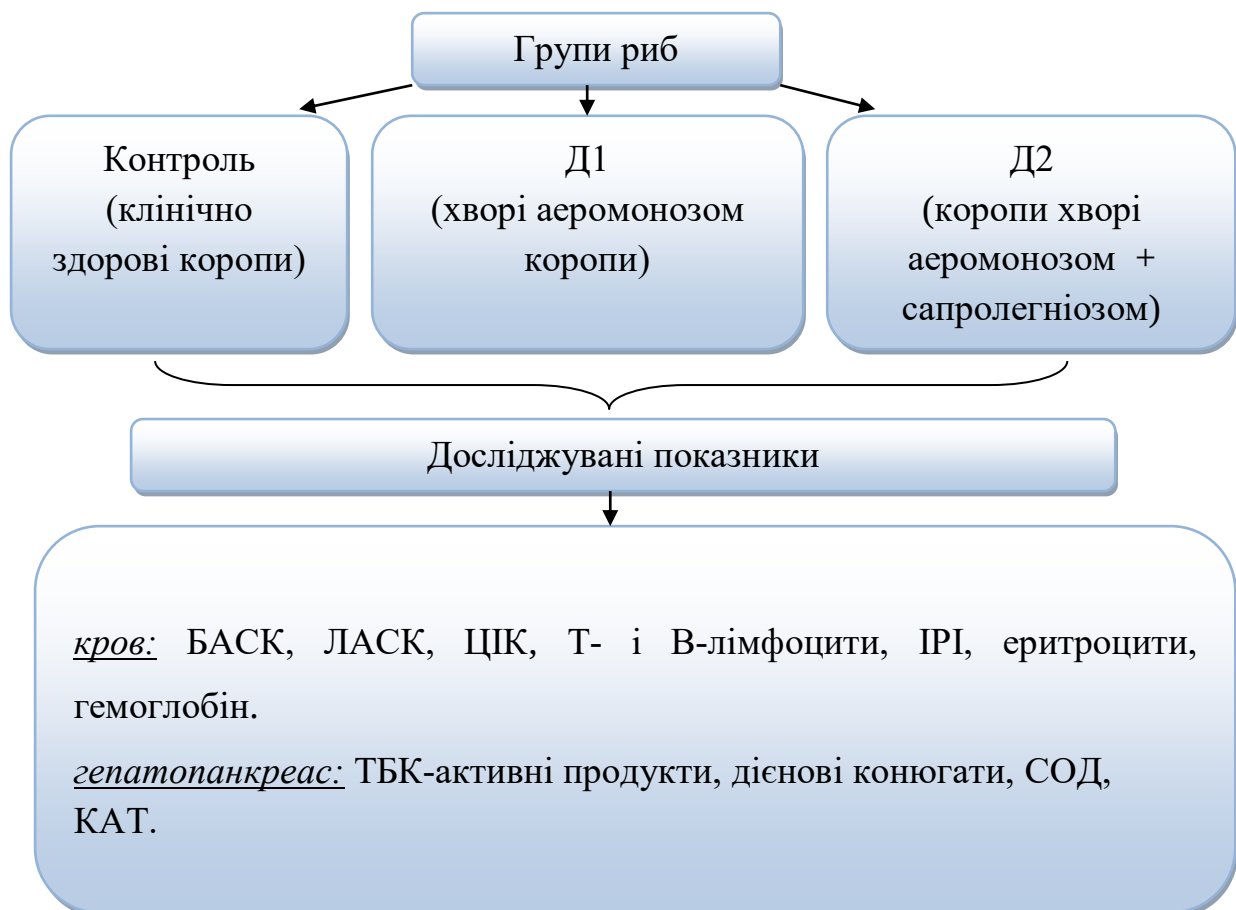


Рис. 2.2. Схема першого етапу досліджень

Метою другого етапу досліджень було з'ясування впливу антибактеріального препарату «Флюмек» самостійно та в комплексі з насінням розторопші плямистої (*Silybum marianum*) на гематологічний та біохімічний профіль крові, стан природного й адаптивного імунного захисту й антиоксидантний потенціал у здорових і хворих аеромонозом коропів.

«Флюмек» (виробник – ТОВ «Ветсинтез», реєстраційне свідоцтво - АВ-05879-01-15) – антибактеріальний препарат, діючою речовиною є флюмеквін, 1г препарату містить 500 мг флюмеквіну, допоміжна речовина – натрію карбонат. Механізм антимікробної дії зумовлений гальмуванням активного ДНК-ферменту гірази, що є головним фактором каталізу синтезу ДНК в ядрі мікробної клітини, в результаті чого настає швидка бактерицидна дія. «Флюмек» відноситься до групи фторхінолонів, та володіє широким спектром протимікробної дії, при пероральному введенні швидко всмоктується, має низьку токсичність, не володіє тератогенними властивостями. Препарати цієї групи діють на мікроорганізми не тільки в період росту та мають не лише антибактеріальну дію, а й постантибіотичний ефект та імуномодулюючу дію. Термін каренції препарату – 10діб

З метою вивчення вказаних питань проведено два досліді. В першому досліді, метою якого було з'ясування впливу антибактеріального препарату «Флюмек», на стан системи антиоксидантного захисту й імунного потенціалу у клінічно здорових дволіток коропа (табл. 2.1).

Для цього було сформовано 3 групи клінічно здорових коропів по 10 особин у кожній, середньою масою $278,6 \pm 9,45$ г та довжиною $l = 23,4 \pm 0,28$ см. Контрольна група риб (К) – отримувала лише 3%-у крохмальну суспензію. Перша дослідна група (Д1), якій через зонд упродовж 7 днів задавали антибактеріальний препарат «Флюмек» з розрахунку 10 мг/кг маси риби у складі 3%-ої крохмальної суспензії, друга дослідна група (Д2) – отримувала 20 мг/кг маси риб. Матеріалом для дослідження слугувала кров, яку брали із серця риб за допомогою піпетки Пастера, та зразки тканин гепатопанкреасу.

Таблиця 2.1

Схема другого етапу досліджень (Дослід 1)

Дослід І		
контроль	І група	ІІ група
Клінічно здорові дволітки коропа		
3% крохмальна суспензія	3% крохмальна суспензія + «Флюмек» 10 мг/кг маси риби	3% крохмальна суспензія + «Флюмек» 20 мг/кг маси риби
Досліджувані біохімічні та імунологічні показники: <u>кров:</u> БАСК, ЛАСК, ЦІК, ФА, ФІ, ФЧ, Т- і В-лімфоцити, ІРІ, гемоглобін, еритроцити. <u>гепатопанкреас:</u> ТБК-активні продукти, дієнові конюгати, СОД, КАТ.		

У другому досліді, метою якого було з'ясування впливу антибактеріального препарату «Флюмек», самостійно та в комплексі з насінням розторопші плямистої (*Silybum marianum* – виробник ТОВ СФГ «Джерела») на гематологічний та біохімічний профіль крові, стан клітинної і гуморальної ланок імунної відповіді й антиоксидантного захисту у хворих аеромонозом коропів (табл. 2.2).

Для виконання цього завдання було сформовано чотири групи дволітки коропа по 10 особин у кожній. Риби І групи були клінічно здорові, ІІ-ІV групу становили клінічно хворі на аеромоноз риби. Перша група – контрольна, клінічно здорова риба, отримувала 3%-у крохмальну суспензію, друга група – хвора аеромонозом риба, отримувала лише 3%-у крохмальну суспензію, третій групі – через зонд упродовж 7 днів вводили антибактеріальний препарат «Флюмек» з розрахунку 10 мг/кг маси риби у складі 3%-ї крохмальної суспензії, четвертій групі – окрім аналогічної дози антибактеріального препарату задавали ще 5 % меленого насіння розторопші плямистої (*Silybum marianum*). Матеріалом для дослідження слугувала кров, яку брали із серця риб

за допомогою піпетки Пастера, попередньо застосовували наркоз з використанням ефірної олії гвоздики (*Oleum Caryophylli*) та зразки тканин гепатопанкреасу.

Таблиця 2.2

Схема другого етапу досліджень (Дослід 2)

Дослід II			
I група (контрольна)	II група	III група	IV група
клінічно здорові дволіткі коропа	хворі аеромонозом коропа		
3% крохмальна суспензія	3% крохмальна суспензія	3% крохмальна суспензія + «Флюмек» 10 мг/кг маси риби	3% крохмальна суспензія + «Флюмек» 10 мг/кг маси риби + 5% меленого насіння розторопші плямистої
Досліджувані біохімічні та імунологічні показники: <u>кров:</u> ЦІК, Т- і В-лімфоцити, ІРІ, загальний протеїн і співвідношення його фракцій, ТБК- активні продукти, ГПЛ, СОД, КАТ, ОМП₃₇₀, ОМП₄₃₀ <u>гепатопанкреас:</u> ТБК-активні продукти, дієнові конюгати, СОД, КАТ. <u>Додатково проводили:</u> – виділення та ідентифікацію збудника захворювання (<i>Aeromonas hydrophila</i>); – тест на чутливість мікрофлори біоматеріалу, хворих на аеромоноз коропів, до антибіотиків (зокрема і «Флюмеку»); – визначення рівня бактеріостатичної активності препарату «Флюмек» по відношенню до ізолятів <i>Aeromonas hydrophila</i>.			

Мета третього етапу досліджень полягала у з'ясуванні впливу синбіотичного препарату «Ентеронормін», активованого водним розчином йоду і селену, на стан імунного й антиоксидантного захисту у коропів, хворих

асоційованою формою аеромонозу (табл. 2.3). Дослідження проводилися на 3-х групах дволітки коропа по 10 особини у кожній. Контрольна група, яку становили клінічно здорові риби, отримувала лише 3%-у крохмальну суспензію, перша дослідна група (Д1) – хворі аеромонозом коропа, яким задавали лише 3%-у крохмальну суспензію, другій дослідній групі (Д2), яку становили хворі аеромонозом коропа, через зонд упродовж 7 днів задавали препарат «Ентеронормін», з розрахунку 2 мг/кг маси риби, у складі 3%-ї крохмальної суспензії. Рибу утримували в басейнах за температури води 16 ° – 18 °С та рН 6,7 – 7,2. Матеріалом для дослідження слугувала кров, яку брали із серця риб та зразки тканин гепатопанкреасу.

Таблиця 2.3

Схема третього етапу досліджень

Контроль	Д1	Д2
клінічно здорові коропа	хворі аеромонозом коропа	
3% крохмальна суспензія	3% крохмальна суспензія	3% крохмальна суспензія + «Ентеронормін» 2мг на 1 кг маси риби
Кров, гепатопанкреас		
Досліджувані біохімічні та імунологічні показники: <u>кров:</u> ЛАСК, ЦІК, ФА, ФІ, ФЧ, Т- і В-лімфоцити, ІРІ, ОМП ₃₇₀ , ОМП ₄₃₀ . <u>гепатопанкреас:</u> ТБК-активні продукти, дієнові конюгати, СОД, КАТ. <u>Додатково проводили:</u> виділення та ідентифікацію бактерії <i>Aeromonas hydrophila</i> .		

Ентеронормін (виробник – ТОВ «СГП «МБС»)) – синбіотичний препарат, що складається з комплексу бактерій – *Enterococcus spp*, *Bacillus subtilis spp*, *Lactobacillus spp*; та допоміжних речовин – хітозану, пептону ферментативного і меленого цукру. Він проявляє антагоністичну активність до широкого спектру патогенних бактерій і грибів. Препарат не має кумулятивної здатності, не

вимагає захисних засобів в умовах виробництва і застосування, та не викликає забруднення навколишнього середовища.

Перед введенням коропам досліджуваний препарат активували згідно рекомендацій виробника 14–16 год. водою, збагаченою іонами біологічно активного йоду та селену у формі «Йодіс+Se» (ТУ У 15.7-30631018-011:2011). «Йодіс+Se» – це високоякісна вода, збагачена за спеціальною технологією багатоатомними іонами йоду; загальна мінералізація не більше 1000,0 мг / дм³, вміст біологічно активного йоду (БАЙ) в формі «Йодіс-концентрату» $50 \pm 5,0$ мг / дм³ і Селену $\leq 0,015$ мг / дм³, допоміжні компоненти – функціональні компоненти та вода до 100 %.

Діагноз на аеромоноз у риб на усіх трьох етапах досліджень ставили за результатами бактеріологічного дослідження (виділення та ідентифікація бактерії *Aeromonas hydrophila* з біоматеріалу одержаного від хворих риб); з урахуванням:

- епізоотологічних даних (хворіють переважно дво- та трілітки, виникнення захворювання найчастіше провокується стрес-фактором);
- клінічних ознак (хвора риба малорухлива, слабо реагує на зовнішні подразники, спостерігається утворення виразок на поверхневих покриттях, асцит, куйовдження луски, екзофтальм);
- патологоанатомічних змін (катарально-геморагічне запалення кишкового тракту, гідратація м'язової тканини та паренхіматозних органів, накопичення рідини в черевній порожнині, збільшення селезінки, зміна її кольору до темно-вишневого, розширення кровоносних судин плавального міхура).

Під час проведення усіх досліджень керувались принципами гуманного ставлення до тварин у відповідності до Конвенції Ради Європи про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях, від 18.03.1986 р. та згідно вимог статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (правила поводження з тваринами,

що використовуються в наукових експериментах, тестуванні, навчальному процесі та виробництві біопрепаратів).

2.2. Методи визначення біохімічних показників

Визначення вмісту розчинних протеїнів. Концентрацію загального протеїну у сироватці крові визначали спектрофотометрично за методом О. Н. Lowry [16]. Суть методу полягає в утворенні кольорових продуктів у результаті реакції ароматичних амінокислот з реактивом Фоліна-Чекальтеу в поєднанні з біуретовою реакцією.

Визначення вмісту гідропероксидів ліпідів у плазмі і гомогенаті тканин. Вміст гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) у крові та гомогенатах тканин визначали за методом, описаним В. В. Мирончиком [4]. Принцип базується на осадженні протеїнів, яке здійснюється трихлороцтовою кислотою (ТХО) з додаванням у середовище тіоціанату амонію. До 0,2 мл плазми крові або гомогенату тканин додавали 2,8 мл етанолу і 0,05 мл 50%-го розчину ТХО. Закривали корками і струшували 5 хв. Потім центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. Одержаного супернатанту відбирали 1,5 мл і додавали 1,2 мл етанолу, струшували, потім додавали 0,02 мл HCl, 0,03 мл 1%-го розчину солі Мора, струшували і через 30 с додавали 0,2 мл 20%-го розчину тіоціанату амонію. Вимірювання оптичної густини проводили протягом 10 хв після додавання тіоціанату амонію на спектрофотометрі при довжині хвилі 480 нм.

$$\Delta D_{480} (\text{ГПЛ}) = D_{480} (\text{Д}) - D_{480} (\text{К})$$

Дослідження вмісту ТБК-активних продуктів в плазмі та гомогенаті тканин. Концентрацію малонового діальдегіду (МДА) визначали за методом С. Н. Коробейникової (1989) [38]. В основі методу лежить реакція між малоновим діальдегідом (МДА) і тіобарбітуровою кислотою (ТБК), яка при високій температурі і кислому середовищі протікає з утворенням триметилового комплексу, що містить 1 молекулу МДА і 2 молекули ТБК.

До 1 мл плазми крові або гомогенату тканин додавали 4,5 мл 20%-го розчину фосфорновольфрамової кислоти і, закривши пробірки корками, перемішуємо, залишаємо на холоді 15 хв. Центрифугували при 3000 об/хв упродовж 15 хв. Надосадову рідину зливали, а до осаду додавали 1,0 мл 0,8%-го розчину тіобарбітурової кислоти, після чого проводили інкубацію впродовж 1 години на водяній бані за температури 100°C. Охолоджували у воді з водопроводу та центрифугували впродовж 10 хв при 6000 об/хв. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі при довжинах 535 нм і 580 нм.

Концентрацію МДА визначали використовуючи коефіцієнт молярної екстинції 0,156 мкМ/ см і виражали її в нмоль/мл (або г) за формулою:

$$C = 0,21 + 26,5 \times \Delta D, \text{ де}$$

C – концентрація ТБК-активних продуктів;

ΔD – оптична густина $D_{535} - D_{580}$.

Визначення концентрації дієнових кон'югатів у плазмі та гомогенаті тканин. Визначення концентрації дієнових кон'югатів проводили за методом, описаним І.Д. Стальною (1977р.) [88], який ґрунтується на реакції оптичної густини гептанізопропанольного екстракту ліпідів. Для цього до 0,2 мл досліджуваної рідини додавали 5мл суміші для екстрагування, яка містила гептан та ізопропиловий спирт в об'ємному співвідношенні 1:1. Далі вміст переносили у пробірки, щільно закривали та центрифугували при 800g впродовж 15хв. Надосадову рідину – 4,5 мл переносили в інші пробірки і додавали 0,5 мл дистильованої води., вміст пробірки енергійно струшували та залишали на 25хв для розшарування фаз. Потім обережно, щоб не захопити водну фазу, відбирали 0,5мл верхньої гептанової фази та додавали 2мл 96% C_2H_5OH і перемішували. Вимірювання проводили на спектрофотометрі при довжині 233нм. Як контроль використовували верхню гептанову фазу екстрагуючої суміші без протеїну, але з додаванням відповідної аліквоти 96% етилового спирту.

Концентрацію дієнових кон'югатів виражали в нмоль/мг протеїну і розраховували за формулою:

$C =$, де

E – значення оптичної густини дослідної проби;

220 – коефіцієнт молярної екстинції для спряжених дієнів поліненасичених вищих жирних кислот;

V – об'єм проби, мл;

a – концентрація протеїну у пробі, мг;

1000 – коефіцієнт перерахунку.

Визначення супероксиддисмутазної активності в крові та гомогенатах тканин. Визначення супероксиддисмутазної активності в еритроцитах крові та гомогенатах тканин проводили за методом, описаним Є. Є. Дубиніною (1983 р.) [28]. В основі цього методу лежить відновлення нітротетразолію супероксидними радикалами, які утворюються в реакції між феназинметасульфатом і відновленою формою нікотинаміддинуклеотидом (NADH). До 0,2 мл досліджуваної рідини додавали 1,8 буфера тріс- HCl, потім 0,5 мл етанолу і 0,3 мл хлороформу. 15 хв перемішували скляною паличкою і 15 хв центрифували при 7–8 тис. об/хв. Відбирали супернатант і слідували наступною схемою: 2,4 мл 0,15 М фосфатного буфера, рН 7,8, а далі по 0,1 мл розчину ЕДТА, розчину желатину, розчину феназинметасульфату, розчину нітротетразолію і також 0,1 мл розчину NADH. Інкубували 20 хв при кімнатній температурі в темному місці. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі при $\lambda=540$. Активність визначали за формулою:

$$A = \frac{E_K - E_D}{m} \times P, \text{ де}$$

A – активність СОД в у.од./мг протеїну;

E_K – екстинція контрольного зразка;

E_D – екстинція дослідного зразка;

m – маса протеїну в 0,1 мл досліджуваної рідини;

P – розведення.

Визначення каталазної активності у сироватці крові та гомогенатах тканин. Принцип методу базується на здатності пероксиду водню утворювати з

солями молібдату стійкий кольоровий комплекс [52]. До 0,1 мл досліджуваної рідини додавали 2 мл H_2O_2 , в холостій пробі додавали 0,1 мл дистильованої води. Після 10 хв проведення реакції додавали 1 мл 4 % молібдату амонію, і через 5 хв в пробірку вносили 0,5 мл 30% ТХО. Інтенсивність забарвлення досліджували, вимірюючи її на спектрофотометрі при $\lambda=410$ нм проти зразка, де додавали дистильовану воду. Результати визначали за формулою:

$$A = \frac{E_{\text{хол}} - E_{\text{д}}}{t \times V \times K \times B} \times P, \text{ де}$$

A – активність КАТ в ммоль H_2O_2 /мг протеїну за 1 хв;

$E_{\text{хол}}$ – екстинція холостого зразка;

$E_{\text{д}}$ – екстинція дослідного зразка;

V – об'єм зразка, мл;

t – час інкубації, хв;

K – коефіцієнт мілімолярної екстинції пероксиду водню, який дорівнює $22,2 \cdot 10^3 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$;

B – кількість протеїну, мг/мл досліджуваної рідини;

P – розведення.

Вміст альдегідних і кетонів похідних окисної модифікації протеїнів (ОМП). Рівень інтенсивності окисної деструкції протеїнів оцінювали за реакцією одержаних карбонільних похідних амінокислотної реакції з динітрофенілгідразином, як описано у Levine R. L. et al., 1990 [199]. Вміст карбонілів розраховували за вимірюванням оптичного поглинання при 370 нм та 430 нм з урахуванням коефіцієнту поглинання $22000 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Карбонільні групи визначали спектрофотометрично за різницею поглинання при 370 нм (альдегідні похідні, OMP_{370}) та 430 нм (кетонів похідні, OMP_{430}). У ході визначення після додавання до 0,1 мл сироватки 0,9 мл ТХО і 1 мл 2,4 динітрофенілгідразину проводили інкубацію при кімнатній температурі і центрифугували 45 хв при 3000 об/хв. Далі суміш промивали сумішшю етанол-ацетат 3 рази. Після додавання сечовини і нагрівання 5 хв на киплячій водяній бані проводили вимірювання при вказаних довжинах хвилі. Концентрацію

альдегідних і кетонових похідних окисної модифікації протеїнів виражали в нмоль/мг протеїну.

Визначення концентрації гемоглобіну. Концентрацію гемоглобіну проводили ціанметгемоглобіновим методом за методичними рекомендаціями В. В. Сельвестрова (1999) [73]. У пробірку вносили 5 мл трансформуючого розчину Драбкіна та додавали 20 мкл цільної крові. Пробірку старанно перемішували та залишали у холодильнику на 20 хвилин.

Оптичну густину отриманого розчину визначали на спектрофотометрі при 540 нм проти трансформуючого розчину. Обчислення концентрації гемоглобіну проводили за формулою:

$$x = d_{540} \times 367,1 \text{ г / л, де}$$

d_{540} – свідчення ФЕК;

367,1 – коефіцієнт перерахунку, що враховує розведення крові.

Визначення кількості еритроцитів [31]. Кількість еритроцитів підраховували у камері Горяєва. Для підрахунку еритроцитів заповнювали кров'ю меланжер до мітки 0,5 і доводили фізіологічним розчином (0,6%) до мітки 101 (розведення у 200 разів). Скляною паличкою з пробірки брали 1-2 краплі розведеної крові і заповнювали ними камеру (починаючи з краю покривного скла). Еритроцити підраховували через 1 хв. Підрахунок числа еритроцитів проводили у 5 великих або 80 малих квадратах розміщених по діагоналі. Враховували еритроцити, які лежать у середині малого квадрату, а також на лівій та верхній лініях. Число еритроцитів у 1 мкл крові вираховували за формулою:

$$X = \frac{a \times 200 \times 4000}{80}, \text{ де}$$

X – кількість еритроцитів у 1 мкл крові;

a – кількість еритроцитів у 80 малих квадратах;

80 – кількість підрахованих малих квадратів;

200 – ступінь розведення крові;

4000 – множник, який приводить результат до об'єму 1 мкл крові.

Визначення вмісту загального протеїну та його спектру. Вміст загального протеїну визначали у плазмі крові – біуретовим реактивом (г/л), якісний та кількісний вміст фракцій розчинних протеїнів – методом вертикального електрофорезу в пластинах 7,5%-го поліакриламідного гелю (ПААГ). Проби для електрофорезу готували: в 7,5%-го ПААГ: 0,1мл плазми крові розбавляли 1:12 електродним буфером (рН 8,5), 0,1 мл проби змішували з аналогічною кількістю 40%-ої сахарози, в лунки концентруючого гелю вносили 0,02 мл (~ 150-200 мкг протеїну). Маркерний барвник – 0,01%-ий розчин бромфенолового синього доданий в електродний буфер перед розбавленням проб. Після електрофорезу гелі фіксували і одночасно фарбували в 12,5%-ій трихлороцтовій кислоті з 0,25%-им водним розчином кумасі R 250. Аналіз вмісту фракцій розчинних протеїнів (%) проводили з використанням програмного забезпечення TotalLab TL120.

2.3. Методи визначення імунологічних показників

Визначення кількості лейкоцитів [51]. Кров з годинникового скла набирали в змішувач для підрахунку еритроцитів ссавців до позначки 0,5 або 1. Кінчик змішувача витирали ватою, набирали розчин А (25 мг нейтральрота і 0,6 г натрію хлористого розчиняли в 100 мл дистильованої води) до половини розширення змішувача, потім до мітки 101 заповнювали розчином Б (12 мг кристалвіолет і 3,8 мг натрію цитрату і 0,4 мл формаліну розчиняли в 100 мл дистильованої води).

Кров набирали до позначки 1, виходить розведення в 100 разів. Після наповнення зі змішувача знімали гумову трубку, затискали його між великим і середнім пальцем і перемішували кров з розбавленою рідиною. Змішувач залишали у горизонтальному положенні на 5-10 хвилин, потім знову перемішували. Перші 2-3 краплі, що виходили із змішувача, струшували і тільки наступної краплею заряджали лічильну камеру. Покривне скло повинно

бути заздалегідь притерто до лічильної камери до появи кілець Ньютона. Під дією розчинів А і В відбувалось забарвлення формених елементів крові. Ядра лейкоцитів фарбуються в темний фіолетово-червоний колір, а протоплазма – в рожевий. В еритроцитах слабо забарвлюються тільки ядра. Завдяки цьому еритроцити і лейкоцити помітні в камері.

Кількість лейкоцитів підраховували у 80 великих квадратах і визначали їх кількість за формулою:

$$x = m \times 250 \times Y / n, \text{ де:}$$

X – кількість лейкоцитів в 1 мкл,

M – загальна кількість клітин у підрахованих квадратах,

Y – ступінь розведення крові,

n – число переглянутих квадратів.

Дослідження популяційного складу Т- і В-лімфоцитів крові.

Визначення відносної кількості Т-лімфоцитів проводили за допомогою методу спонтанного та індукованого розеткоутворення з еритроцитами барана у якості маркерів [121]. Принцип методу полягає в здатності лімфоцитів, за відповідних умов, утворювати так звані «розетки» з гетерогенними еритроцитами, в центрі якої знаходиться лімфоцит, а по периферії еритроцити, завдяки наявності на мембранах лімфоцитів специфічних рецепторів. За кількістю еритроцитів, адсорбованих одним лімфоцитом, судять про ступінь активності Т-клітин, оскільки цей феномен зумовлений щільністю рецепторів на поверхні лімфоцитів і характеризує функціональні властивості останніх.

Хід визначення:

приготування забуференого фізіологічного розчину для відмивання лімфоцитів. У чисту колбу відважували 8,2 г NaCl х.ч., 2,3 г Na₂HPO₄ та 0,2 г NaH₂PO₄, доводили дистильованою водою до 1 л і розчиняли, рН розчину 7,2 – 7,4 (7,3);

градієнт густини фікол-верографіну готували наступним чином. У мірний циліндр відважували 9,5 г фіколу, розчиняли його теплою

дистильованою водою в кількості 100 мл, додавали 20 мл верографіну 60%-ої концентрації. Відносну густину вимірювали за допомогою ареометра (1,077).

У якості маркерів для приготування індикаторної системи використовували еритроцити, які отримували з цільної дефібринованої крові барана. З осаду еритроцитів готували 0,5% завись еритроцитів для визначення загальних ТЕ-лімфоцитів і 0,1% активних ТА-лімфоцитів.

Виділення лімфоцитів. Мононуклярну фракцію клітин виділяли з гепаринізованої крові коропів. Кров розводили забуференим фізіологічним розчином у співвідношенні 1:3. Розведену кров по стінці пробірки нашаровували на розчин фікол-верографіну і центрифугували протягом 20 хв при 1500 об/хв. Піпеткою відбирали верхній шар (плазму). Після цього шприцом з довгою голкою обережно відбирали білувате кільце мононуклеарних клітин у вигляді хмаринки на межі двох фракцій, переносили у чисту пробірку і тричі відмивали забуференим фізрозчином шляхом центрифугування при 1000 об/хв протягом 10 хв.

Визначення відносної кількості загальних лімфоцитів (ТЕ-РУЛ) проводили за допомогою методу спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана. Для цього, у пробірки вносили 0,1 мл чистих лімфоцитів, додавали 0,1 мл 0,5 % зависі еритроцитів кози. Суміш інкубували в термостаті впродовж 7 хв при температурі 25°C, центрифугували 5 хв при 1000 об/хв, ставили у холодильник на одну годину, після чого фіксували 0,1 мл 0,3%-го розчину глютарового альдегіду протягом 10 хвилин. Зупиняли реакцію додаванням 0,4 мл дистильованої води, центрифугували 3 хв при 1000 об/хв, надосад відбирали, осад ресуспендували і робили мазок на предметному склі. Для приготування мазків використовували чисті, знежирені у спирт-ефірі (1:1) предметні скельця. Мазки висушували, фіксували метанолом, фарбували 7–10 хвилин за Романовським-Гімза. Мікроскопію мазків проводили під імерсією при збільшенні 90х7. За Т-розеткоутворюючі лімфоцити приймали клітини, які приєднали до себе не менше трьох еритроцитів барана. При цьому розрізняли їх за кількістю приєднаних еритроцитів: нульові – які не приєднали еритроцити,

малодиференційовані (низькоавідні) — які приєднали від 3 до 5 еритроцитів барана, середньоавідні — які приєднали 6–10 еритроцитів барана, високодиференційовані (високоавідні) — які приєднали більше 10 еритроцитів (морула).

Визначення відносної кількості активних лімфоцитів (ТА-РУЛ)

дозволяє виявити високоафінні рецептори до еритроцитів барана, які активно з'єднуються з ними без додаткової стимуляції. Для цього, у пробірки вносили 0,1 мл чистих лімфоцитів, додавали 0,1 мл 0,1 % зависі еритроцитів барана, центрифугували протягом 5 хвилин при 1000 об/хв, надосад відбирали, осад ресуспендували, після чого фіксували 0,1 мл 0,3%-го розчину глютарового альдегіду протягом 10 хвилин. Зупиняли реакцію додаванням 0,4 мл дистильованої води, центрифугували 3 хв при 1000 об/хв, надосад відбирали, осад ресуспендували і робили мазок на предметному склі. Мікроскопію мазків проводили аналогічно.

Визначення відносної кількості теофілінрезистентних Т-лімфоцитів [51] ґрунтується на тому, що ці клітини несуть на своїй поверхні рецептори до імуноглобулінів класу М, а Т-супресори — до імуноглобулінів G. Хелперними вважають лімфоцити, які здатні формувати розетки після їх інкубації з теофіліном — це теофілінрезистентні клітини. Для цього готують 0,09 %-ий розчин теофіліну на забуференому фізіологічному розчині.

У чисті сухі пробірки вносили 0,1 мл зависі чистих лімфоцитів, додавали 0,1 мл 0,09%-го розчину теофіліну, інкубували протягом 30 хв при температурі 25°C, після чого двічі відмивали забуференим фізіологічним розчином протягом 10 хвилин. Відбирали надосад, осад ресуспендували, додавали 0,1 мл 0,5 % зависі еритроцитів барана, інкубували 7 хвилин при температурі 25°C, центрифугували 5 хвилин при 1000 об/хв. Пробірки ставили у холодильник на одну годину, після чого фіксували 0,3%-им розчином глютарового альдегіду, додаючи його у кількості 0,1 мл (10 хв.). Зупиняли фіксацію додаванням 0,4 мл дистильованої води, потім центрифугували 5 хв при 1000 об/хв, відбирали

надосад, осад ресуспендували і робили мазок на предметному склі. Мікроскопію мазків проводили аналогічно.

Кількість теофілінчутливих лімфоцитів T-супресорів визначали за різницею, отриманою після віднімання із загальної кількості ТЕ–РУЛ кількості хелперів.

Дослідження відносної кількості В-лімфоцитів. Метод ідентифікації В-лімфоцитів ґрунтується на наявності в них мембранних імуноглобулінових рецепторів, що забезпечує приєднання до В-лімфоцитів індикаторних клітин, котрі на своїй поверхні містять комплемент-антиген-комплекс (ЕАС-РУЛ). У якості індикаторних клітин використовували еритроцити барана, сенсibilізовані антитілами і комплементом. Для приготування комплемент-антиген-комплексу використовували готову рідку гемолітичну сироватку (титр 1:1200) та готовий сухий комплемент морської свинки.

З метою отримання ЕАС-розеток на В-лімфоцитах, до 0,1 мл чистої суспензії лімфоцитів додавали 0,1 мл 1%-го розчину еритроцитів барана, котрі містять на своїй поверхні комплекс імуноглобулін антитіло-комплемент. Суміш інкубували у термостаті впродовж 7 хвилин за температури 25° С, центрифугували при 1000 об/хв і ставили у холодильник на одну годину, після чого фіксували 0,3%-им розчином глутарового альдегіду. Зупиняли фіксацію додаванням 0,4 мл дистильованої води, потім центрифугували 5 хв при 1000 об/хв, відбирали надосад, осад ресуспендували та робили мазок на предметному склі. Мікроскопію мазків проводили аналогічно.

Дослідження лізоцимної активності сироватки крові. Визначення лізоцимної активності у сироватці крові проводили нефелометричним методом за Дорофейчуком В. Г., 1968 [25]. Для цього з добової тест-культури, вирощеної на скошеному агарі, готували наважку на фосфорному буфері рН 7,2–7,4, яку стандартизували на ФЕКу при використанні зеленого світлофільтра в кюветах з робочою довжиною 3 мм. Світлопропускання вихідної наважки повинно скласти 20 %. До 1,47 мл приготованої мікробної наважки додавали 0,03 мл досліджуваної сироватки. Пробірки струшували та витримували в

термостаті при 25°C впродовж години. Після цього пробірки знову струшували та проводили нефелометрію. Відсоток лізоцимної активності визначали шляхом вирахування відсотка світлопропускання вихідної мікробної наважки (20 %) з відсотка світлопропускання досліджуваної наважки.

Дослідження фагоцитарної активності крові. Фагоцитоз є головним механізмом природної резистентності та обов'язковою ланкою індукції та формування специфічної імунної відповіді. Фагоцитуючу роль виконують поліморфно-ядерні лейкоцити та моноядерні фагоцити (моноцити і макрофаги).

Фагоцитарну активність (ФА) визначали за методом Гостева В. С. [16] у модифікації. З цією метою 0,2 мл гепаринізованої крові вносили в пробірку та мікропіпеткою додавали стандартизовану до 2 млрд/мл завись добової культури. Вміст пробірок добре збовтували та ставили на водяну баню при температурі 25 °C на 30 хв. Потім готували мазки на предметних скельцях, висушували їх на повітрі та фарбували за методом Романовського-Гімза. У кожному мазку підраховували 100 нейтрофілів. Для повної характеристики фагоцитозу визначали фагоцитарну активність за кількістю активних лейкоцитів із 100 підрахованих і виражали у відсотках, фагоцитарний індекс – за кількістю фагоцитованих мікробних тіл, яка припадає на один активний нейтрофіл і характеризує поглинаючу здатність фагоцитів, фагоцитарне число за кількістю фагоцитованих мікробних тіл на 100 підрахованих нейтрофілів. Вирахували фагоцитарне число (ФЧ) і фагоцитарний індекс (ФІ) за формулами:

$$\text{ФІ} = \text{к-сть фагоц-х мікроорганізмів} / \text{ФА};$$

$$\text{ФЧ} = \text{к-сть фагот-х мікроорганізмів} / 100.$$

Дослідження бактерицидної активності сироватки крові. Бактерицидну активність сироватки крові оцінювали фотонейфелометричним кюветним методом за Марковим Ю. М., 1968 [73]. У якості тест-мікробу використовували слабо патогенний штам *A.hydrophila*. Спочатку готували добову бульйонну культуру *A.hydrophila*. Для цього з добової агарової культури бактерії змивали стерильним фізіологічним розчином, отриманий змив

стандартизували за оптичним стандартом до 2 млрд. мікробних тіл в 1 мл. Після чого робили посів бактеріологічною петлею на м'ясо-пептонний бульйон (МПБ). Після посіву пробірки поміщали в термостат за температури 25°C на 24 години. У якості поживного середовища при визначенні бактерицидної активності крові використовували бульйон Хоттінгера, що містив 200 мг % амінного азоту. Досліджувані сироватки зберігали при температурі 2–4°C і досліджували не пізніше 20–24 годин після взяття крові.

При дослідженні бактерицидної активності сироватки крові в стерильні кювети з робочою довжиною 10 мм заливали по 4,5 мл бульйону Хоттінгера і додавали по 0,5 мл досліджуваного матеріалу (дослідна кювета). У кожен дослідну кювету вносили по одній бактеріологічній петлі добової бульйонної культури. У контрольні кювети вносили ті ж компоненти, що і в дослідні, але замість сироватки додавали 0,5 мл фізіологічного розчину. Оптичну густину середовища в дослідних і контрольних кюветах визначали за допомогою ФЕК–56. Після цього пробірки поміщали в термостат за температури 25 °C. Повторне визначення оптичної густини проводили через 3, 5, 7, 9, 12 та 24 години. На основі даних оптичної густини вмісту дослідних і контрольних кювет визначали динаміку бактерицидної активності сироватки крові, відповідно вказаним проміжкам часу, а також повний бактерицидний ефект, що виражається одним значенням – середньою напруженістю бактерицидної активності (НБА).

Розрахунки робили наступним чином. Спочатку за формулою 1 визначали бактерицидну активність сироватки крові через прийняті проміжки часу:

$$A = 100 - \frac{D_{\text{дослідне через } t \text{ годин}} - D_{\text{дослідне зразу}}}{D_{\text{дослідне зразу}}} \cdot 100$$

$$D_{\text{дослідне через } t \text{ годин}} - D_{\text{дослідне зразу}}, \text{ де}$$

A — бактерицидна активність (%);

D — дослідна густина;

t — час експозиції кювет в термостаті в годинах.

Потім визначали середню напруженість бактерицидної активності (НБА) за формулою 2:

$$\text{Середня НБА} = \frac{A_n \cdot T_n}{T_n} = \frac{A_1 T_1 + A_2 T_2 + A_3 T_3 \dots A_n T_n}{T_n} \quad 2$$

$$T_n = T_1 + T_2 + T_3 + \dots T_n, \text{ де}$$

середня НБА — середня напруженість бактерицидної активності сироватки крові (%);

$T_1, T_2, T_3 \dots T_n$ — тривалість термостатування в годинах.

Визначення циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у сироватці крові [16]. Цей метод ґрунтується на преципітації великих глобулярних імунних комплексів, що знаходяться у сироватці крові високомолекулярним поліетиленгліколем (ПЕГ-6000). Для визначення готували 0,1 М боратний буфер (рН 8,4) та розчин ПЕГ шляхом розчинення в 240 мл цього буферу 10 г сухого ПЕГ. Змішували 0,15 мл сироватки крові з 0,3 мл боратного буферу, суміш розливали мікропіпеткою у дві пробірки по 0,2 мл. В першу пробірку (контроль) додавали 1,8 мл розчину ПЕГ, а в другу (дослід) — 1,8 боратного буферу. Контрольні і дослідні пробірки інкубували в термостаті протягом 60 хвилин. Після інкубації визначали величину екстинції на спектрофотометрі при довжині хвилі 450 нм. Результати досліджень подавали в мМоль/мл, показник екстинції множили на 100.

2.4. Методи мікробіологічних досліджень

Виділення та ідентифікація бактерій [110]. Мікробіологічні дослідження проводили в два етапи. Спочатку робили первинний посів патологічного матеріалу на поживне середовище м'ясо-пептонний агар (МПА), яке інкубували в термостаті за температури 26⁰С протягом 24 год. Для зменшення вологості поверхні агару чашки готували заздалегідь, підсушуючи їх в термостаті.

Наступним етапом було виділення чистих культур мікроорганізмів. На

чашку з МПА, попередньо розділену на сектори, петлею наносили культуру мікроорганізму, відібрану з окремої колонії, проводячи зигзагоподібний штрих по поверхні першого сектора, а потім послідовно засівали інші сектори, не стерилізуючи петлі. Таким чином, на перших секторах отримували суцільний ріст, а вздовж решти штрихів виростали окремі колонії. Потім вивчали їхні культуральні та морфологічні властивості.

Для дослідження морфологічних особливостей колоній природних культур їх титрували до 5 БУО/мл і висівали на щільне живильне середовище, після чого інкубували в термостаті за температури 27°C впродовж 72 годин. Бактеріальні колонії, що утворилися на живильному середовищі, досліджували за допомогою біокулярного мікроскопу, описуючи морфологічні особливості за такими параметрами, як розмір колонії (велика, середня, дрібна), її колір, край (рівний, розірваний), поверхня (гладенька, шорстка), профіль.

Колонії з однаковими морфологічними особливостями виокремлювали, пересівали і за умови що морфологічні особливості колоній не змінювалися навіть після 5 пересівання на свіже живильне середовище отримані природні культури бактерій вважали чистим, після чого культури знову фарбували за Грамом.

За даними морфологічних та біохімічних досліджень проводили ідентифікацію виділених бактерій до родини, роду та виду за допомогою визначника Берджі.

Культуральні властивості вивчали на твердих і рідких поживних середовищах. Колонії бактерій характеризувались за величиною, формою, прозорістю, кольором, поверхнею, структурою та консистенцією.

У процесі дослідження було використано такі біохімічні тести: тест на оксидазу, каталазу, О/Ф тест, тест для виявлення відновлення нітрату до нітриту, реакція визначення сірководню та індолу, тест на ферментацію вуглеводів, тест на уреазу, дослідження використання цитрату, визначення орнітин-, лізиндекарбоксилази та аргініндегідролази.

Морфологічні властивості бактерій досліджували шляхом мікроскопіювання мазків, пофарбованих за Грамом у модифікації Бюрка на мікроскопі *Microscope XS-3320*. Перевіряли чистоту виділеної культури та відзначали форму, розміри бактеріальної клітини.

Визначення чутливості бактерій *A.hydrophila* до антибіотиків. Чутливість мікрофлори біоматеріалу до антибіотиків досліджували методом дифузії в агар з використанням стандартних дисків з антибіотиками та середовища Мюллера-Хінтона, виробництва *HiMedia Laboratories Pvt Ltd*. Для визначення чутливості мікроорганізмів до флюмеквіну готували стерильні паперові диски, які просочували розчином препарату «Флюмек» так, щоб диск містив 50 мкг флюмеквіну. Результати тесту на чутливість інтерпретували згідно Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals [211].

Визначення мінімальних інгібуючих концентрацій флюмеквіну в антибактеріальному препараті «Флюмек». Методом серійних розведень у рідкому поживному середовищі визначали мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) флюмеквіну в препараті «Флюмек» для ізолятів *Aeromonas hydrophila*. Для цього готували розведення препарату з такими концентраціями флюмеквіну: 250; 125; 62,5; 31,5; 16,0; 8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25 мкг/мл. Отримані значення МІК флюмеквіну інтерпретували наступним чином: МІК $\leq$ 2 мкг/мл – штам чутливий; МІК = 4 мкг/мл – штам помірно чутливий; МІК $\geq$ 8 мкг/мл – штам резистентний.

2.5. Методи статистичного аналізу

Одержані цифрові дані опрацьовано статистично з використанням програмного пакету Microsoft Excel для персональних комп'ютерів, за

допомогою загальноприйнятих методів варіаційної статистики з визначенням середніх величин (M) та їх квадратичної похибки (m). Для оцінки вірогідності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стюдента. Вірогідною вважали різницю при показах вірогідності $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Постановка діагнозу, коротка характеристика збудника

Діагноз на аеромоноз у риб ставили на підставі епізоотологічних даних, клінічних ознак хвороби, патолого-анатомічних змін та результатів бактеріологічного дослідження.

При постановці діагнозу враховували епізоотологічні дані – хворіють переважно дво- та трилітки, виникнення захворювання найчастіше провокується стрес-фактором.

З клінічних ознак спостерігали наступне – хвора риба малорухлива, слабо реагувала на зовнішні подразники, спостерігається утворення виразок на поверхневих покриттях (рис. 3.1), асцит, куйовдження луски (рис. 3.2) та екзофтальм (рис. 3.3).



Рис. 3.1. Виразки на поверхневих покриттях коропа

Часто на шкірі виявляли виразки різної форми та величини з білуватим обідком по краях і з некрозом тканини в центрі. Навколо виразок спостерігалось запалення шкіри.



Рис. 3.2. Куйовдження луски у дослідних риб.



Рис. 3.3. Екзофтальм – вип'ячування очей.

Патолого-анатомічні зміни характеризувалися крововиливами в серцеву сорочку, під капсулу печінки. Жовчний міхур був переповнений

жовчю, печінка та нирки анемічні і дряблі, селезінка збільшена, темно-вишневого кольору. Також спостерігали катарально-геморагічне запалення кишкового тракту (рис. 3.4), розширення кровоносних судин плавального міхура, в окремих екземплярів – гідратацію м'язової тканини та паренхіматозних органів, накопичення рідини в черевній порожнині.



Рис. 3.4. Ураження кишкового тракту у хворих коропів

Для виділення та ідентифікації бактерій мікробіологічні дослідження проводили в два етапи. Спочатку робили первинний посів патологічного матеріалу на поживне середовище м'ясо-пептонний агар (МПА), наступним етапом було виділення чистих культур мікроорганізмів.

Морфологічні властивості бактерій вивчали шляхом мікроскопіювання мазків, пофарбованих за Грамом у модифікації Бьорка на мікроскопі *Microscope XS-3320*. Шляхом мікроскопіювання чистих культур в мазках виявляли короткі Грам (-) палички із заокругленими кінцями або кокопалички (рис. 3.5). Було встановлено, що ці бактерії давали позитивний тест на оксидазу. За типом дихання при постановці О/Ф тесту на середовищі Хью-Лейфсона віднесені до факультативних анаеробів. Ізольовані штами володіли дихальним та ферментативним шляхами розщеплення глюкози. Штами бактерії *A. Hydrophila* на цьому ж середовищі мали рухливість та газоутворення.

В процесі дослідження було використано такі біохімічні тести:

1. тест на оксидазу. На фільтрувальний папір наносили декілька крапель 1%-го розчину диметил – п-фенілендіамін дигідрохлорида та культуру бактерій. При наявності оксидази відмічали зміну кольору на рожевий;

2. тест на каталазу. Однодобову культуру суспендували в краплі 3%-го пероксиду водню. При наявності каталази спостерігали утворення бульбашок газу;

3. О/Ф (окиснення-ферментації) тест для визначення типу утилізації глюкози та газоутворення. Інокулювали 2 пробірки середовища Хью-Лейфсона. В одну пробірку був доступ кисню, іншу заливали стерильним вазеліновим маслом. О/Ф середовище містить індикатор бромтимоловий синій (за нейтрального рН- зелений), який змінює забарвлення на жовтий у присутності кислот, що вказує на метаболізм вуглеводу. Якщо вуглевод метаболізується у двох пробірках, можна говорити про те, що має місце процес бродіння. Якщо мікроорганізми здатні споживати вуглевод лише шляхом окиснення, то кислота буде утворюватись лише у відкритих пробірках. Газоутворення можна побачити у вигляді пухирців та розривів напіврідкого середовища. Також на цьому середовищі визначали рухливість мікроорганізмів;

4. для виявлення відновлення нітрату до нітриту у кожен пробірку з нітратним бульйоном після культивування мікроорганізмів додавали реактив Грісса, до складу якого входять сульфанілова кислота і α -нафтиламін. Якщо мікроорганізми відновлювали нітрат до нітриту, в середовищі накопичувалася азотиста кислота (HNO_2). Сульфанілова кислота реагує з азотистою і діазотується. Діазотована сульфанілова кислота вступає в реакцію з α -нафтиламином з утворенням червоного забарвлення, що свідчить про позитивну реакцію;

5. реакція визначення сірководню. Інокулювали МПБ культурою мікроорганізму, перед інкубацією індикаторний папірець, просочений

ацетатом свинцю закріплювали пробкою. При виділенні сірководню спостерігали почорніння індикаторного папірця через 24 год;

6. реакція визначення індолу. Спосіб, що ґрунтується на використанні індикаторного папірця, просоченого водним розчином щавлевої кислоти за методикою Мореля. Папірець розташовували під пробкою над поверхнею рідкого середовища. Бактерії культивували за 37⁰С впродовж 24 год. Індикаторний папірець за позитивної реакції на індол набував забарвлення від бузково-рожевого до інтенсивно малинового;

7. ферментацію вуглеводів проводили у напіврідкому середовищі Гісса. Це середовище інокулювали однодобовою культурою та інкубували при температурі 26⁰С. При зброджуванні даного вуглеводу відзначали пожовтіння середовища (утворення кислоти) та газоутворення. Готове середовище Гісса з індикатором бромтимоловим пурпурним фіолетового кольору, при кислотоутворенні – жовтіє;

8. тест на уреазу. Інокулювали скошений агар Крістенса з сечовиною та інкубували. При наявності цього ферменту відмічали появу червоно - фіолетового кольору;

9. використання цитрату. Суспензію мікроорганізму наносили штрихом на скошену поверхню цитратного агару Сімонса. Інкубували 7 діб. При використанні цитрата спостерігали появу блакитного кольору (підлучення середовища);

10. визначення орнітин-, лізиндекарбоксилази та аргініндегідролази. Середовище для визначення декарбоксилази (і аргініндегідролази) розділяли на 4 частини. До кожної з трьох частин додавали відповідну амінокислоту, а четверту залишали без амінокислоти для контролю.

Бактерії *A. hydrophila* добре росли на живильних середовищах як за температури 26⁰С, так і за 30⁰С, утворюючи напівпрозорі, з сіруватим відтінком колонії, що легко знімалися з субстрату. Через 48 годин інкубації за 26⁰С діаметр колонії сягав 3-4 мм. Пігментоутворення було відсутнє. На середовищі МПБ виділені штами аеромонад утворювали рівномірне

помутніння, а на дні осад.

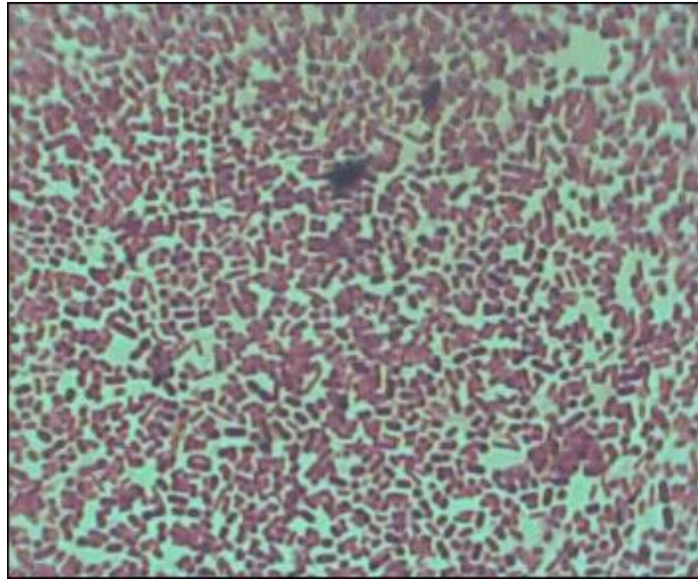


Рис. 3.5. Бактерії роду *Aeromonas* пофарбовані за Грамом x100

Культуральні властивості вивчали на твердих і рідких поживних середовищах. Колонії бактерій характеризувались за величиною (середні, дрібні), формою (круглі, неправильної форми), прозорістю (прозорі, напівпрозорі), кольором (матові, з пігментом), поверхнею (плоскі, опуклі, гладенькі, зморшкуваті), структурою та консистенцією.

Паралельно з біохімічним аналізом виділених аеромонад, проводили ідентифікацію виділених штамів *Aeromonas* з використанням стандартизованої тест-системи API 20E (*BioMerieux*, Франція), яка призначена для ідентифікації Грам (-) паличок на основі 21-ї біохімічної реакції (рис. 3.6–3.7).

За допомогою даної тест-системи було проведено ідентифікацію трьох культур, виділених від коропа: ізоляти під номерами 3916, 4016 та 4416 внесено в музейний фонд Відділу іхтіопатології Інституту рибного господарства НААН України (м. Київ).

Далі результати розшифровували за допомогою визначника Берджі [96]. Виділені штами віднесено до роду *Aeromonas*, виду *Aeromonas hydrophila*.



Рис. 3.6. Стандартизована тест-систем API 20Е одразу після внесення культури бактерій

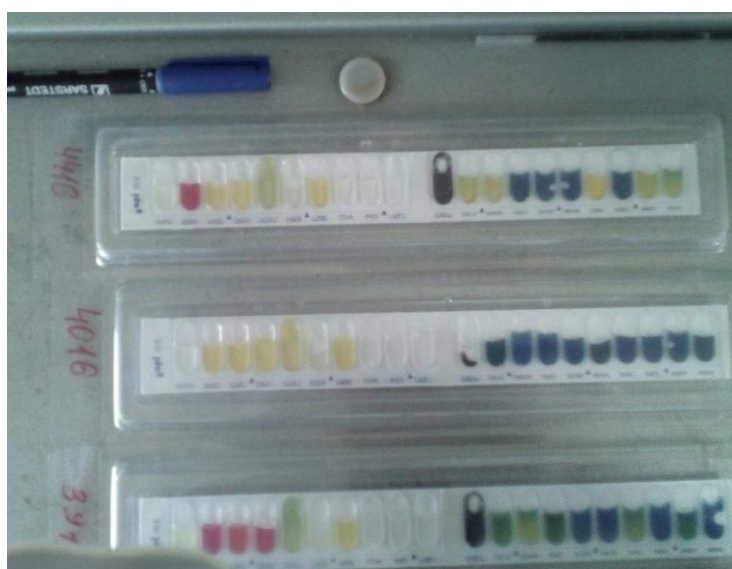


Рис. 3.7. Стандартизована тест-систем API 20Е через 24–28 год

Діагноз на сапролегніоз ставили на основі епізоотологічних даних, клінічних ознак та мікроскопування гіфів грибів на рибі.

При постановці діагнозу враховували епізоотологічні дані — до сапролегніозу відносять захворювання риб та ікри, що викликаються представниками сапролегнієвих грибів (*Saprolegniales*), які є сапрофітами та постійно присутні у ґрунтах та воді водойм. Найчастіше сапролегніоз розвивається на фоні іншого захворювання (в даному випадку — на фоні аеромонозу) чи в разі різкого зниження захисних функцій організму риб

внаслідок погіршення умов вирощування. Оскільки у риб, уражених аеромонозом, були пошкодження зовнішніх покривів та виразки, це стало сприятливим фактором розвитку сапролегніозу (рис. 3.8).



Рис. 3.8. Ватоподібні розростання гриба на місці виразок, спричинених аеромонозом (ураження в ділянці спинного, анального, хвостового и грудного плавців).

Сапролегніоз виявляється у вигляді ватоподібного розростання гриба, що складається з переплетених гіфів на різних ділянках тіла (рис.3.9), плавцях, зябрах. Руйнуючи епідерміс гіфи порушують важливі функції слиновиділення, дихання, осморегуляції. У місцях ураження розвивається запалення, що у тяжких випадках супроводжується набряком шкіри, крововиливами, підвищеним слиновиділенням. В окремих випадках гіфи через зовнішні покриви можуть потрапляти в м'язову тканину та внутрішні органи. З розвитком хвороби риба стає млявою, не реагує на зовнішні подразники. Сапролегніоз варто розглядати як вторинне захворювання, оскільки спочатку уражаються травмовані ділянки тіла риб, а тоді патологічний процес поширюється на здорові ділянки.



Рис. 3.9. Дволітка коропа уражена аеромонозом асоційованим із сапролегніозом: а) пошкодження зовнішніх покривів спричинене аеромонозом, б) розростання гіфів гриба *Saprolegnia*.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що досліджувані риби згідно клінічних ознак, патолого-анатомічних змін та враховуючи епізоотологічні дані уражені аеромонозом та аеромонозом асоційованим із сапролегніозом.
2. Згідно проведених досліджень морфологічних і культуральних властивостей бактерій, виділених від хворих риб, та біохімічних тестів встановлено, що виділені бактерії – *Aeromonas hydrophila*. Проведено ідентифікацію виділених штамів бактерій з використанням стандартизованої тест-системи API 20E (BioMerieux, Франція). За результатами досліджень виділені штами віднесено до роду *Aeromonas*, виду *Aeromonas hydrophila*.
3. Діагноз на сапролегніоз підтверджували мікроскопування гіфів грибів на рибі, при цьому враховували епізоотологічні дані та клінічні ознаки.

4. При асоційованій інфекції у хворих риб спостерігали ватоподібні розростання гіфів гриба *Saprolegnia* у місцях пошкодження зовнішніх покривів та виразках від ураження аеромонозом.

Основні результати досліджень, які описані у цьому підрозділі, опубліковані у наступних працях [50, 79, 86].

3.2. Стан системи антиоксидантного захисту й імунного потенціалу коропа, ураженого аеромонозом та сапролегніозом

3.2.1. Інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів та активність ензимів системи антиоксидантного захисту у гепатопанкреасі коропів, уражених аеромонозом та сапролегніозом. Однією із основних змін клітинного метаболізму є активація пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), за якого утворюються гідроперекиси ліпідів, дієнові кон'югати та ТБК-активні продукти. Продукти ПОЛ є невід'ємною частиною здорового організму та сприяють підтриманню сталого біохімічного статусу клітин [69]. У нормальних умовах їх кількість у тканинах знаходиться на сталому рівні. Проте збільшення продуктів ПОЛ може свідчити про порушення захисної функції організму, а зменшення – детектуються при хронічних захворюваннях.

З наведених у таблиці 3.1 даних бачимо, що ураження коропів асоційованою формою аеромонозу з нашаруванням сапролегніозу спричиняє зростання вмісту продуктів ПОЛ у гепатопанкреасі. Так, вміст дієнових кон'югатів, первинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів, у гепатопанкреасі риб першої і другої дослідних груп був відповідно в 1,2 і 1,4 ($p < 0,05$) разу більший, ніж у контрольній. Виявлений при цьому значно більший вміст дієнових кон'югатів у у гепатопанкреасі коропів 1-ї і 2-ї дослідних груп, порівняно до контрольної, свідчить про інтенсивне окиснення утворених дієнових жирних кислот пероксидним шляхом. Разом з цим у

гепатопанкреасі коропів за асоційованої інфекції виявлено тенденцію до зростання вмісту кінцевого продукту ПОЛ – ТБК-активних продуктів.

Таблиця 3.1

**Вміст продуктів ПОЛ у гепатопанкреасі досліджуваних коропів
($M \pm m$, $n=4$)**

Показники	Група риб		
	контроль	I група	II група
Дієнові конюгати, нмоль /мг протеїну	0,98±0,07	1,27±0,75*	1,39±0,14*
ТБК-активні продукти, нмоль/мг протеїну	1,91±0,13	1,92±0,47	2,03±0,37

Примітка. У цій та наступних таблицях різниці вірогідні відносно коропів контрольної групи: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Таким чином, як показали результати досліджень, у коропів другої дослідної групи, яку становили коропи із асоційованою інфекцією аеромонозу із сапролегніозом, зростання вмісту продуктів ПОЛ було виражено більшою мірою, ніж у першій дослідній групі, яку становили коропи уражені аеромонозом. Ці дані свідчать про більший інгібуючий вплив асоційованої інфекції на інтенсивність процесів ПОЛ в організмі коропів.

Отже, ураження коропів асоційованим захворюванням аеромонозу з нашаруванням сапролегніозу призводить до активації процесів пероксидного окиснення ліпідів у гепатопанкреасі риб на початкових стадіях окиснення, а саме – на стадії утворення дієнових кон'югатів.

Відомо, що у процесі еволюції в організмі риб виробилися спеціальні механізми захисту від деструктивної дії продуктів ПОЛ, які дістали назву антиоксидантної системи. Її роль полягає у регуляції інтенсивності утворення активних форм кисню (АФК) та знешкодженні продуктів ПОЛ [212, 262].

З даних, наведених у таблиці 3.2 бачимо, що активність ключових антиоксидантних ензимів – супероксиддисмутази та каталази у гепатопанкреасі коропів дослідних груп значно нища, ніж в особин контрольної групи. Ці зміни були виражені більшою мірою у риб другої дослідної групи, яку становили коропи із асоційованою інфекцією аеромонозу із сапролегніозом. Зокрема,

каталазна активність у гепатопанкреасі коропів, хворих аеромонозом асоційованим з сапролегніозом (II група), була в 1,3 раза ($p < 0,05$) нища, ніж у клінічно здорової риби контрольної групи (табл. 3.2). Відомо, що серед усіх органів найбільше каталази знаходиться у печінці. Це один з головних ензимів руйнування АФК, тобто каталаза основний первинний антиоксидант системи захисту.

Таблиця 3.2

**Активність антиоксидантних ензимів у гепатопанкреасі
досліджуваних коропів ($M \pm m$, $n=4$)**

Показники	Група риб		
	контроль	I група	II група
Каталаза, Мкмоль H_2O_2 /хв. х мг протеїну	46,09 $\pm$ 0,01	45,82 $\pm$ 0,63	36,63 $\pm$ 3,24*
СОД, Ум. Од/хв. мг протеїну	11,59 $\pm$ 0,92	8,77 $\pm$ 0,55*	5,08 $\pm$ 0,62**

Супероксиддисмутаза є ключовим ензимом антиоксидантної системи. Вона знешкоджує супероксидні радикали, перетворюючи їх у менш токсичний пероксид водню. При дослідженні супероксиддисмутазної активності у гепатопанкреасі досліджуваних коропів виявлено її зниження у 1,3 ($p < 0,05$) разу в першій дослідній групі та у 2,3 ($p < 0,01$) – у другій дослідній групі, стосовно контрольної.

Отже, результати проведених досліджень свідчать, що ураження коропів збудниками аеромонозу з нашаруванням сапролегніозу спричиняє інгібуючий вплив на активність ключових ензимів антиоксидантної системи. Зниження супероксиддисмутазної та каталазної активності у гепатопанкреасі хворих коропів можна розглядати як прояв певного виснаження антиоксидантного потенціалу організму внаслідок поступового пошкодження її компонентів вільними радикалами і продуктами ПОЛ.

3.2.2. Вплив аеромонозу та сапролегніозу на гематологічний профіль і стан гуморальної ланки природної резистентності організму коропів. Відомо, що кров є однією з перших систем, яка швидко і відповідно реагує на

несприятливі фактори зовнішнього середовища, в тому числі і на розвиток різних захворювань. З даних, представлених у табл. 3.3. бачимо, що ураження коропів збудниками аеромонозу з нашаруванням сапролегніозу істотно не впливало на вміст загального протеїну у сироватці крові, різниці стосовно риб контрольної групи були не вірогідні. Проте у коропів другої групи, виявлено тенденцію до збільшення вмісту протеїну у крові.

Подібні результати досліджень, тільки виражені більшою мірою, зафіксовані при дослідженні інших гематологічних показників. Так, виявлено зменшення в 1,5 і 1,6 разу кількості еритроцитів у крові коропів першої та другої дослідних груп, а також зниження на 17,8 і 20,6 % концентрації гемоглобіну в крові риб уражених аеромонозом та аеромонозом із сапролегніозом стосовно контрольної групи, відповідно. Подібні результати одержані при дослідженні гематологічних показників у інших видів риб, уражених аеромонозом [9, 102].

Таблиця 3.3

Гематологічні показники досліджуваних коропів ($M \pm m$, $n=4$)

Показники	Група риб		
	контроль	I дослідна група	II дослідна група
Білок, г/л	21,4 $\pm$ 1,6	21,9 $\pm$ 1,82	24,0 $\pm$ 1,11
Еритроцити, Т/л	2,7 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,1*	1,7 $\pm$ 0,16*
Гемоглобін, г/л	89,3 $\pm$ 4,07	73,4 $\pm$ 0,9*	70,9 $\pm$ 2,2*

Бактерицидна активність сироватки крові (БАСК) є інтегральним фактором природної резистентності організму гуморального типу і свідчить про здатність крові до самоочищення. Вона зумовлена наявністю у сироватці крові комплексу речовин – комплементу, антитіл, лізоциму, пропердину, здатних знешкоджувати, чи нейтралізувати мікробні клітини. З наведених у таблиці 3.4 даних бачимо, що БАСК за ураження коропів збудниками аеромонозу та аеромонозу з нашаруванням сапролегніозу зростає у двох

дослідних групах у 1,4 разу ($p<0,05$). Подібні зміни виявлено при дослідженні лізоцимної активності сироватки крові. Зокрема, ЛАСК у коропів першої і другої дослідної груп була відповідно в 1,2 ($p<0,01$) і 1,3 разу ($p<0,01$) вищою, ніж у контрольній групі. Ці дані свідчать, що ураження коропів збудниками аеромонозу з нашаруванням сапролегніозу призводить до підвищення активності гуморальної ланки неспецифічної резистентності риб. Про що також вказує виявлене нами зростання вмісту циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові риб дослідних груп. Так, вміст ЦІК у сироватці крові коропів першої і другої дослідної груп був відповідно в 1,7 ($p<0,05$) і 1,5 разу ($p<0,05$) більший, ніж в особин контрольної групи. Циркулюючі імунні комплекси характеризують ступінь синтезу антитіл в організмі і спрямовані на елімінацію патогенних антигенів.

Таблиця 3.4

**Показники неспецифічної резистентності досліджуваних коропів
($M \pm m$, $n=4$)**

Показники	Групи риб		
	контроль	I дослідна група	II дослідна група
БАСК, %	45,9 $\pm$ 4,53	66,0 $\pm$ 3,89*	65,4 $\pm$ 1,14*
ЛАСК, %	39,0 $\pm$ 0,71	47,3 $\pm$ 1,08**	49,0 $\pm$ 0,71**
ЦІК, Ммоль/л	45,7 $\pm$ 3,63	77,0 $\pm$ 4,95*	69,0 $\pm$ 2,83*

Імовірно, хворі коропи першої та другої дослідних груп перебували на початковій стадії захворювання, оскільки відомо, що при потраплянні чужорідного антигену в організм риб у першу чергу активується вроджена система імунітету, неспецифічні фактори захисту. З даних літератури відомо, що на початковій стадії інфекції у периферичній крові риб збільшується кількість нейтрофілів, моноцитів і макрофагів, які беруть участь в імунній відповіді, підвищується їх фагоцитарна активність, зростає концентрація лізоциму і білків системи комплементу, починається синтез фактора активації макрофагів [157].

3.2.3. Вплив аеромонозу асоційованого з сапролегніозом на кількість та функціональну активність Т- і В-лімфоцитів крові коропа. Відомо, що лімфоцити є головними імунокомпетентними клітинами в організмі риб. Вони є носіями імунологічної пам'яті та попередниками антитілоутворюючих клітин. Їх роль значною мірою характеризує вміст Т- і В-лімфоцитів та їх субпопуляцій у периферичній крові. З даних, наведених у таблицях 3.5–3.9 бачимо, що захворювання коропів на аеромоноз, а також з нашаруванням сапролегніозу, призводить до зміни кількості та функціональної активності імунокомпетентних клітин крові. Зокрема, зафіксовано меншу ($p<0,001$) загальну кількість Т-лімфоцитів у крові коропів першої дослідної групи, у яких констатовано аеромоноз (табл.3.5).

Таблиця 3.5

Відносна кількість Т-загальних лімфоцитів та їх окремих субпопуляцій у крові досліджуваних коропів ($M\pm m$, $n=4$)

Показники ТЕ-РУЛ	Група риб		
	контроль	I дослідна група	II дослідна група
0	64,6 $\pm$ 0,4	68,3 $\pm$ 0,4**	67,6 $\pm$ 1,7
3-5	30,3 $\pm$ 0,8	28,0 $\pm$ 0,5*	28,6 $\pm$ 1,0
6-10	4,3 $\pm$ 0,4	3,3 $\pm$ 0,4	3,67 $\pm$ 0,8
M	0,6 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,4	0
%	35,3 $\pm$ 0,4	31,3 $\pm$ 0,4***	30,6 $\pm$ 1,02*

Ці зміни відбувалися на тлі збільшення ($p<0,01$) у крові кількості «нульових», неактивних у функціональному відношенні лімфоцитів та зменшення кількості ТЕ-РУЛ з низькою ($p<0,05$) щільністю рецепторів у порівнянні з особинами контрольної групи. У другій дослідній групі, яку становили коропи, хворі аеромонозом з нашаруванням сапролегніозу, на тлі зменшення ($p<0,05$) загальної кількості Т-лімфоцитів виявлено тенденцію до збільшення кількості «неактивних» та зменшення кількості ТЕ-РУЛ з низькою і середньою щільністю рецепторів.

Зміни кількості «активних» Т-лімфоцитів (табл. 3.6), які мають високоафінні рецептори до індикаторних клітин і активно взаємодіють з ними без додаткової сенсibilізації, були не вірогідні. Разом з цим, у риб другої дослідної групи, уражених збудниками аеромонозу з нашаруванням сапролегніозу, виявлено тенденцію до зменшення загальної кількості ТА-РУЛ ($27,3 \pm 1,8$ у досліді проти $30,6 \pm 2,4$ у контролі). При цьому в особин обох дослідних груп зафіксовано тенденцію до збільшення кількості неактивних і середньоавідних і зменшення кількості низькоавідних ТА-РУЛ.

Таблиця 3.6

Відносна кількість Т-активних лімфоцитів та їх окремих субпопуляцій у крові досліджуваних коропів ($M \pm m$, $n=4$)

Показники ТА-РУЛ	Група риб		
	контроль	I дослідна група	II дослідна група
0	$69,3 \pm 2,4$	$70 \pm 3,2$	$72,6 \pm 1,7$
3-5	$26 \pm 1,8$	$22 \pm 2,4$	$21 \pm 1,2$
6-10	$3 \pm 0,7$	$4,6 \pm 0,4$	$4,6 \pm 0,4$
M	0	0	0
%	$30,6 \pm 2,4$	$30 \pm 3,2$	$27,3 \pm 1,8$

Відомо, що Т-лімфоцити поділяються на функціонально відмінні популяції, основними з яких є Т-хелпери (Th) і цитотоксичні (Tc або CTL) клітини. Ідентифікацію Т-клітин проводять шляхом визначення у них експресійних мембранних білків, які відрізняються у функціонально різних популяціях. Ці білки являються фенотипічними маркерами різноманітних популяцій лімфоцитів. Т-лімфоцити відіграють важливу роль у селективному розпізнаванні імуногенів і в активації антиген-специфічних В-лімфоцитів.

При дослідженні кількості теофілін-резистентних Т-лімфоцитів виявлено подібні зміни, тільки виражені меншою мірою, ніж при визначенні ТА-РУЛ (табл. 3.7). При цьому привертає увагу зростання ($p < 0,05$) кількості

«неактивних» Th-РУЛ у крові коропів другої дослідної групи на тлі тенденції до зниження популяції лімфоцитів з низькою і середньою ступінню авідності.

Таблиця 3.7

Відносна кількість Th-РУЛ та їх окремих субпопуляцій у крові досліджуваних коропів ($M \pm m$, $n=4$)

Показники Th-РУЛ	Група риб		
	контроль	I дослідна група	II дослідна група
0	78,6 $\pm$ 1,0	79,6 $\pm$ 0,4	82 $\pm$ 0,8*
3-5	18,0 $\pm$ 0,8	17,3 $\pm$ 0,4	15,6 $\pm$ 0,8
6-10	2,6 $\pm$ 0,4	3 $\pm$ 0	2,3 $\pm$ 0,4
M	0	0	0
%	20,6 $\pm$ 2,0	20,3 $\pm$ 0,4	18,0 $\pm$ 1,2

Захворювання коропів аеромонозом призвело до зменшення у крові в 1,3 разу ($p < 0,05$) кількості Т-лімфоцитів супресорів стосовно особин контрольної групи (табл. 3.8). При цьому виявлено тенденцію до зниження їх кількості у коропів, уражених аеромонозом асоційованим із сапролегніозом, однак різниці не вірогідні.

Таблиця 3.8

Відносна кількість Ts-лімфоцитів та імунорегуляторний індекс у крові досліджуваних коропів ($M \pm m$, $n=4$)

Показники	Група риб		
	контроль	I дослідна група	II дослідна група
Ts, %	14,7 $\pm$ 1,0	11,0 $\pm$ 1,0*	12,4 $\pm$ 0,4
IPi	1,4 $\pm$ 0,49	1,8 $\pm$ 0,12	1,4 $\pm$ 0,04

Визначення імунорегуляторного індексу, як відношення між теофілін-резистентними і теофілін-чутливими лімфоцитами крові використовується для оцінки лімфоцитарної функції імунокомпетентних клітин у нормі та за патології. Проведеними дослідженнями вірогідних змін величини

імунорегуляторного індексу у крові коропів обох дослідних груп стосовно контрольної, не виявлено (табл. 3.8).

Дослідження кількості і функціональної активності антигензв'язуючих В-лімфоцитів (ЕАС-РУЛ) наведені у таблиці 3.9. З одержаних даних бачимо, що захворювання коропів на аеромоноз асоційований із сапролегніозом призводить до зменшення ($p<0,05$) загальної кількості ЕАС-РУЛ. Перерозподіл авідності В-лімфоцитів у крові коропів другої дослідної групи відбувався за одночасного збільшення кількості неактивних ЕАС-РУЛ ($p<0,05$) та зменшення клітин із низькою щільністю рецепторів ($p<0,05$). Подібні зміни, тільки виражені меншою мірою, зареєстровано у коропів уражених аеромонозом. Вірогідні різниці констатовано лише за кількістю неактивних і низькоавідних ЕАС-РУЛ ($p<0,05$).

Таблиця 3.9

Відносна кількість В-лімфоцитів у крові досліджуваних коропів ($M \pm m$, $n=4$)

Показники ЕАС-РУЛ	Група риб		
	контроль	I дослідна група	II дослідна група
0	70,33±0,41	73,67±0,44*	74,67±0,82*
3-5	22,33±0,41	19,00±0,22*	19,67±0,41*
6-10	5,00±0,00	5,33±0,41	4,00±0,71
M	2,67±0,41	1,33±0,41	1,33±0,41
%	29,67±0,41	28,33±1,87	25,33±0,82*

Отже, результати проведених досліджень свідчать що захворювання коропів на аеромоноз та асоційовану інфекцію аеромонозу з сапролегніозом спричиняє імуносупресивний вплив на ефektorну ланку імунної відповіді – зменшується загальна кількість Т-лімфоцитів та знижується їх функціональна активність за рахунок перерозподілу рецепторного апарату імунокомпетентних клітин. При цьому у крові хворих коропів зафіксовано зменшення кількості Т-супресорів на тлі однакового рівня імунорегуляторного індексу. Разом з цим констатовано подібні зміни у визначенні кількості і функціональної активності

антигензв'язуючих В-лімфоцитів крові, особливо за асоційованої інфекції аеромонозу з сапролегніозом.

ВИСНОВКИ

1. Захворювання коропів аеромонозом асоційованим із сапролегніозом спричиняє порушення балансу в прооксидантно-антиоксидантній системі гепатоцитів коропів, що призводить до підвищення інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів і зниження антиоксидантного потенціалу організму риб. Вказане дозволяє розглядати отримані результати, як одну із ланок у патогенезі цих захворювань.

2. За умов захворювання коропів аеромонозом і аеромонозом асоційованим із сапролегніозом виявлено вірогідне зменшення кількості еритроцитів і концентрації гемоглобіну, що вказує на порушення оксиген-транспортної функції крові.

2. Констатовано підвищення активності гуморальних механізмів неспецифічної резистентності за ураження коропів збудниками аеромонозу з нашаруванням сапролегніозу. Про що свідчать вірогідне підвищення бактерицидної і лізоцимної активності сироватки крові та збільшення вмісту циркулюючих імунних комплексів у коропів дослідних груп стосовно контрольної.

3. Захворювання коропів на аеромоноз та асоційовану інфекцію аеромонозу з сапролегніозом спричиняє імуносупресивний вплив на ефекторну ланку імунної відповіді – зменшується кількість Т-лімфоцитів (загальних і теофілін-чутливих) та знижується функціональна активність ТЕ-РУЛ. При цьому у крові хворих коропів зафіксовано зменшення кількості антигензв'язуючих В-лімфоцитів, а також низькоавідних їх форм за одночасного збільшення неактивних ЕАС-РУЛ. Вказані зміни були виражені більшою мірою у крові коропів, уражених асоційованою інфекцією аеромонозу та сапролегніозу.

Основні результати досліджень, які описані у цьому підрозділі, опубліковані у наступних працях [78, 83, 84].

3.3. Стан антиоксидантного захисту й активність клітинної та гуморальної ланок імунітету коропа за впливу різних доз антибактеріального препарату «Флюмек»

Метою наступного етапу досліджень, згідно зазначеної вище схеми, було з'ясування впливу антибактеріального препарату «Флюмек» самотійно та в комплексі з насінням розторопші плямистої (*Silybum marianum*) на інтенсивність процесів ПОЛ й активність ензимів системи антиоксидантного захисту, гематологічні показники, стан природного й адаптивного імунітету у здорових і хворих аеромонозом коропів.

З метою вивчення вказаних питань проведено два досліді. В першому досліді з'ясовували вплив різних доз антибактеріального препарату «Флюмек» на гематологічний профіль, стан системи антиоксидантного захисту й імунного потенціалу у клінічно здорових дволіток коропа. Дослідження проведено на трьох групах клінічно здорових коропів. Контрольна група риб отримувала лише 3%-у крохмальну суспензію. Першій дослідній групі через зонд упродовж 7 днів задавали антибактеріальний препарат «Флюмек» з розрахунку 10 мг/кг маси риби у складі 3%-ої крохмальної суспензії, друга дослідна група аналогічно отримувала вказаний препарат у дозі 20 мг/кг маси риб.

3.3.1. Активність ензимів системи антиоксидантного захисту й інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів у гепатопанкреасі коропа за дії різних доз препарату «Флюмек».

Аналіз даних літератури свідчить, що активація процесів пероксидного окиснення ліпідів супроводжується окисненням органічних сполук та утворенням токсичних для організму риб

пероксидних продуктів. Це зумовлює необхідність підтримання високого рівня активності систем антиоксидантного захисту організму, порушення функціонування яких може призвести до негативних змін структурно-функціональних властивостей біомембран та значного ураження клітин відповідних тканин та органів [15].

Відомо, що вміст продуктів ПОЛ у печінці риб є біомаркером, який характеризує її фізіологічний стан за дії токсичних речовин і патогенів [91]. Проведені дослідження показали (табл. 3.10), що вміст дієнових кон'югатів у гепатопанкреасі коропів першої та другої дослідних груп був відповідно у 3,3 ($p<0,05$) та 1,9 рази ($p<0,05$) менший, ніж в особин контрольної групи. При цьому введення коропам першої дослідної групи препарату «Флюмек» дозою 10 мг/кг маси викликало тенденцію до зниження вмісту ТБК-активних продуктів у гепатопанкреасі. Натомість уведення коропам у складі 3%-ої крохмальної суспензії препарату «Флюмек» дозою 20 мг/кг маси істотно не впливало на рівень ТБК-активних продуктів у гепатопанкреасі.

Таблиця 3.10

Вміст продуктів ПОЛ у гепатопанкреасі коропів за дії різних доз препарату «Флюмек» ($M \pm m$, $n=4$)

Показники	Група риб		
	контроль	I група 10 мг/кг маси риби	II група 20 мг/кг маси риби
Дієнові конюгати, нмоль /мг протеїну	0,59±0,06	0,18±0,02*	0,31±0,07*
ТБК, нмоль/мг протеїну	2,41±0,13	2,26±0,07	2,45±0,06

Ці дані свідчать про інгібуючий дозозалежний вплив антибактеріального препарату «Флюмек» на інтенсивність утворення первинних продуктів ПОЛ у гепатопанкреасі коропів, при цьому вміст кінцевих продуктів істотно не змінювався. На тлі зменшення у гепатопанкреасі коропів дослідних груп вмісту продуктів ПОЛ, зафіксовано зміни активності основних

антиоксидантних ензимів. Зокрема, як бачимо з даних, наведених у таблиці 3.11, введення коропам першої дослідної групи антибактеріального препарату «Флюмек» дозою 10 мг/кг маси спричиняло підвищення у 2,1 разу ($p<0,05$) супероксиддисмутази активності у гепатопанкреасі. Натомість введення більшої дози препарату, а саме 20 мг/кг маси, істотно не впливало на супероксиддисмутази активність – одного із ключових ензимів системи антиоксидантного захисту в організмі риб. Водночас, на відміну від супероксиддисмутази активності, каталазна активність у гепатопанкреасі коропів за введення різних доз препарату «Флюмек» істотно не відрізнялась за цим показником від риб контрольної групи.

Таблиця 3.11

Активність антиоксидантних ензимів у гепатопанкреасі коропів за дії різних доз препарату «Флюмек» ($M \pm m$, $n=4$)

Показники	Група риб		
	контроль	I група 10 мг/кг маси риби	II група 20 мг/кг маси риби
Каталаза, Мкмоль H_2O_2 /хв. х мг протеїну	53,20 $\pm$ 0,16	53,74 $\pm$ 0,24	52,05 $\pm$ 1,66
СОД, Ум. Од/хв. мг протеїну	4,76 $\pm$ 0,39	10,13 $\pm$ 0,59*	5,17 $\pm$ 0,29

Отже, результати проведених досліджень показали, що досліджуваний препарат «Флюмек» при оральному введенні його клінічно здоровим коропам дозою 10 мг/кг маси не тільки не проявляє інгібуючого впливу на активність антиоксидантних ензимів, а спричиняє підвищення супероксиддисмутази активності.

3.3.2. Вплив антибактеріального препарату «Флюмек» на гематологічний профіль та активність клітинної і гуморальної ланок неспецифічної резистентності коропів. Досліджувані гематологічні показники, зокрема, кількість еритроцитів та концентрація гемоглобіну у крові коропів дослідних і контрольної груп були в межах нормативних величин для цієї вікової та видової групи риб (табл.3.12). Вірогідних змін у кількості еритроцитів і концентрації гемоглобіну у крові коропів дослідних груп порівняно до контрольної не зафіксовано. Це свідчить про відсутність порушення оксиген-транспортної функції і гемолізу еритроцитів крові риб за дії різних доз досліджуваного антибактеріального препарату.

Таблиця 3.12

Гематологічні показники крові дволіток коропа за дії різних доз препарату «Флюмек» ($M \pm m$, $n=3-5$)

Показник	Група риб		
	контрольна	I дослідна 10 мг/кг	II дослідна 20 мг/кг
Гемоглобін, г/л	51,35 $\pm$ 1,28	49,88 $\pm$ 1,05	52,95 $\pm$ 2,74
Еритроцити, Т/л	1,81 $\pm$ 0,01	1,72 $\pm$ 0,02	1,80 $\pm$ 0,03

Утворення імунних комплексів в організмі є результатом специфічної взаємодії антигенів з антитілами. Циркулюючі імунні комплекси (ЦІК) відносять до високомолекулярних білкових сполук, структура та функція яких залежить від фізико-хімічних та біологічних властивостей.

У риб, які отримували досліджуваний препарат у кількості 10 мг/кг маси тіла, вміст циркулюючих імунних комплексів становив 51,7 $\pm$ 1,78 ммоль/л і практично не відрізнявся від контрольної групи, де їх вміст – 50,3 $\pm$ 1,78 ммоль/л, а при застосуванні більшої дози препарату – 20 мг/кг маси, зафіксовано збільшення їх рівня до 60,3 $\pm$ 2,16 ммоль/л, що вказує на тенденцію до підвищення антигенного навантаження на організм коропів (табл.3.13).

Введення коропам у складі 3%-ої крохмальної суспензії препарату «Флюмек» дозою 10 мг/кг маси спричиняло підвищення лізоцимної ($p<0,05$) і бактерицидної активності сироватки крові (табл.3.13). Водночас, застосування більшої дози препарату – 20 мг/кг маси, викликало тенденцію до зниження бактерицидної активності, проте істотно не впливало на лізоцимну активність сироватки крові риб.

Таблиця 3.13

Показники гуморальних факторів неспецифічної резистентності дволіток коропа за дії різних доз препарату «Флюмек» ($M \pm m$, $n=3-5$)

Показник	Група риб		
	контрольна	I дослідна (10 мг/кг)	II дослідна (20 мг/кг)
Бактерицидна активність, %	39,04 $\pm$ 1,43	50,57 $\pm$ 4,46	37,07 $\pm$ 4,07
Лізоцимна активність, %	32 $\pm$ 1,87	42,0 $\pm$ 0,71*	33,0 $\pm$ 2,94
ЦІК, ммоль/л	50,3 $\pm$ 1,78	51,7 $\pm$ 1,78	60,3 $\pm$ 2,16

Згідно сучасних уявлень фагоцитоз є першою фазою неспецифічної імунної реакції в результаті якої антиген зазнає змін, що приводить до утворення великої кількості антигенних детермінант. При дослідженні показників фагоцитозу поряд з фагоцитарною активністю визначають фагоцитарний індекс і фагоцитарне число. Вплив препарату «Флюмек» на клітинну ланку неспецифічної резистентності організму досліджуваних коропів виражений меншою мірою, ніж гуморальних (табл. 3.14).

За дії вказаного препарату виявлені тенденції до підвищення фагоцитарної активності та фагоцитарного індексу гранулоцитів крові коропів дослідних груп стосовно контрольної. Водночас, у крові коропів обох дослідних груп, порівняно до контрольної, зафіксовано зростання ($p<0,05$) фагоцитарного числа, що виражає кількість фагоцитованих мікробних клітин на 100 підрахованих лейкоцитів.

Таблиця 3.14

Показники фагоцитозу гранулоцитів крові корокових риб за дії різних доз препарату «Флюмек» ($M \pm m$, $n=3-5$)

Показник	Група риб		
	контрольна	I дослідна (10 мг/кг)	II дослідна (20 мг/кг)
ФА, %	28,67±0,88	29,33±0,82	31,33±0,76
ФІ, од	8,96±0,39	9,82±0,44	9,62±0,44
ФЧ, %	2,57±0,09	3,1±0,15*	3,00±0,06*

Загалом, одержані дані свідчать про те, що введення коропам у складі 3%-ої крохмальної суспензії препарату «Флюмек» дозою 10 мг/кг маси спричиняло стимулювальний вплив на активність гуморальної ланки природного захисту і сприяло зростанню потужності фагоцитозу. За умов застосування коропам більшої дози досліджуваного препарату разом з підвищенням фагоцитарного числа констатовано зростання на 19,9 % вмісту ЦІК, що вказує на антигенне навантаження на організм риб.

3.3.3. Кількість та функціональна активність Т- і В-лімфоцитів крові коропів за дії різних доз препарату «Флюмек». Відомо, що для оцінки резистентності риб до захворювань використовують різноманітні методичні прийоми аналізу структурно-функціонального стану імунної системи. Одним з таких є дослідження кількості і функціональної активності Т- і В-лімфоцитів крові та їхніх регуляторних субпопуляцій [120]. З наведених у таблиці 3.15 даних бачимо, що пероральне введення коропам дослідних груп різних доз препарату «Флюмек» спричиняло зменшення загальної кількості Т-лімфоцитів у крові коропів дослідних груп стосовно контрольної. При цьому у коропів другої дослідної групи різниці порівняно до контрольної виявилися вірогідні. На тлі зниження загальної кількості Т-лімфоцитів у крові коропів дослідних груп стосовно контрольної зафіксовано збільшення кількості неактивних і зменшення низькоавідних ТЕ-РУЛ і, особливо в особин другої дослідної групи.

Таблиця 3.15

Відносна кількість Т-загальних лімфоцитів та їх окремих субпопуляцій у крові досліджуваних коропів за дії різних доз препарату «Флюмек» ($M \pm m$, $n=3-5$)

Показники ТЕ-РУЛ	Група риб		
	контрольна	I група 10 мг/кг маси риби	II група 20 мг/кг маси риби
0	68,67± 0,41	70,33±0,82	72,33± 0,41 **
3-5	22,67±0,41	20,67±0,41*	19,67±0,41*
6-10	7,33±0,41	8,00±0,71	7,00±0,71
M	1,33±0,41	1,00±0,00	1,00±0,71
%	31,33±0,41	29,67±0,82	27,67±0,41**

Необхідно зауважити, що кількість ТЕ-РУЛ з низькою щільністю рецепторів була меншою ($p<0,05$), а «нульових», неактивних у функціональному відношенні - більшою ($p<0,01$), ніж у контролі. Водночас у крові коропів першої дослідної групи, яким вводили препарат «Флюмек» у дозі 10 мг/кг маси, зареєстровано лише зменшення кількості низькоавідних ТЕ-РУЛ ($p<0,05$). Подібні зміни, тільки виражені меншою мірою, зафіксовано при дослідженні кількості Т-активних лімфоцитів крові (табл. 3.16).

Таблиця 3.16

Відносна кількість Т-активних лімфоцитів та їх окремих субпопуляцій у крові досліджуваних коропів за дії різних доз препарату «Флюмек» ($M \pm m$, $n=3-5$)

Показники ТА-РУЛ	Група риб		
	контрольна	I група 10 мг/кг маси риби	II група 20 мг/кг маси риби
0	72,67±1,08	73,00±0,71	74,33±0,41
3-5	20,00± 0,71	18,67± 0,41	18,00± 0,71
6-10	6,67±0,41	7,67±0,41	6,33±0,41
M	0,67±0,41	0,67±0,41	0,67±0,41
%	27,33±1,08	27,00±0,71	24,67±0,41

За введення королам препарату «Флюмек» у дозі 20 мг/кг маси тіла виявлено тенденцію до зменшення загальної кількості ТА-РУЛ на тлі зростання неактивних і зниження низькоавідних ТА-РУЛ.

При дослідженні кількості теофілін-резистентних Т-лімфоцитів у крові коропів дослідних груп виявлено подібні зміни. Про це вказує менша ($p<0,01$) їх загальна кількість у крові коропів, яким задавали «Флюмек» у дозі 20 мг/кг маси риби, стосовно контрольної. При цьому в особин цієї групи кількість неактивних Th-РУЛ була більша ($p<0,05$), а низькоавідних менша ($p<0,05$), ніж у контрольній. У коропів першої групи, яким застосовували досліджуваний препарат у дозі 10 мг/кг маси риби, різниці стосовно контрольної групи були не вірогідні.

Таблиця 3.17

Відносна кількість Th-РУЛ та їх окремих субпопуляцій у крові досліджуваних коропів за дії різних доз препарату «Флюмек» ($M\pm m$, $n=3-5$)

Показники Th-РУЛ	Група риб		
	контрольна	I група 10 мг/кг маси риби	II група 20 мг/кг маси риби
0	77,00 $\pm$ 0,00	78,00 $\pm$ 0,71	79,67 $\pm$ 0,41*
3-5	17,67 $\pm$ 0,41	16,00 $\pm$ 0,71	15,67 $\pm$ 0,41*
6-10	5,33 $\pm$ 0,41	6,00 $\pm$ 0,71	4,67 $\pm$ 0,41
%	23,00 $\pm$ 0,00	22,00 $\pm$ 0,71	20,33 $\pm$ 0,41**

Пероральне введення королам різних доз антибактеріального препарату «Флюмек» не викликало істотних змін у кількості теофілін чутливих Т-лімфоцитів.

При цьому також не зафіксовано змін у співвідношенні теофілін чутливих і теофілін резистентних Т-лімфоцитів, про що свідчить відсутність змін імунорегуляторного індексу (табл. 3.18).

Таблиця 3.18

Відносна кількість Ts-лімфоцитів та імунорегуляторний індекс у крові досліджуваних коропів за дії різних доз препарату «Флюмек» ($M \pm m$, $n=3-5$)

Показники	Група риб		
	контрольна	I група 10 мг/кг маси риби	II група 20 мг/кг маси риби
Т-супресори, %	8,33 $\pm$ 0,41	7,67 $\pm$ 1,47	7,33 $\pm$ 0,41
ІРІ	2,70 $\pm$ 0,12	3,00 $\pm$ 0,60	2,77 $\pm$ 0,18

З наведених у таблиці 3.19 даних бачимо, що загальна кількість В-лімфоцитів у крові коропів дослідних груп була на рівні контрольної. При цьому також не виявлено вірогідних змін у кількості їх окремих субпопуляцій. Ці дані свідчать про відсутність впливу введення різних доз препарату «Флюмек» на кількість і функціональну активність В-клітинної ланки специфічного імунітету риб.

Таблиця 3.19

Відносна кількість В-лімфоцитів (ЕАС-РУЛ) у крові досліджуваних коропів ($M \pm m$, $n=3-5$)

В-лімфоцити (ЕАС-РУЛ)	Група риб		
	контрольна	I група 10 мг/кг маси риби	II група 20 мг/кг маси риби
0	78,33 $\pm$ 0,82	79,33 $\pm$ 1,08	80,00 $\pm$ 0,71
3-5	16,00 $\pm$ 0,71	15,67 $\pm$ 0,41	15,33 $\pm$ 0,41
6-10	5,67 $\pm$ 0,41	5,00 $\pm$ 0,71	4,67 $\pm$ 0,41
М	0	0	0
%	21,67 $\pm$ 0,82	20,67 $\pm$ 1,08	20,00 $\pm$ 0,71

Отже, результати проведених досліджень свідчать, що пероральне задавання коропам у складі 3%-ої крохмальної суспензії препарату «Флюмек» істотно не впливало на кількість і функціональну активність Т-лімфоцитів (активних і теофілін-чутливих) та В-лімфоцитів крові. Водночас за дії досліджуваного препарату у дозі 20 мг/кг маси риби, зафіксовано зменшення у

крові кількості загальних і теофілін-резистентних Т-лімфоцитів. При цьому встановлено зниження їх функціональної активності за рахунок перерозподілу рецепторного апарату вказаної популяції Т-лімфоцитів крові (збільшення кількості неактивних і зниження низькоавідних їх форм), що вказує на дозозалежний вплив препарату на активність специфічного захисту риб.

ВИСНОВКИ

1. Пероральне введення коропам у складі 3%-ої крохмальної суспензії різних доз препарату «Флюмек» спричиняло інгібуючий вплив на інтенсивність утворення первинних продуктів ПОЛ (дієнових конюгатів) у гепатопанкреасі риб, проте істотно не змінювало рівень ТБК-активних продуктів. При цьому виявлено вищу супероксиддисмутазну активність у гепатопанкреасі коропів, яким задавали досліджуваний препарат дозою 10 мг/кг маси риби.
2. Констатовано дозозалежний імуносупресивний вплив препарату «Флюмек» на активність гуморальної ланки природних механізмів захисту риби, зокрема бактерицидної і лізоцимної активності сироватки крові. Водночас за дії досліджуваного препарату не виявлено змін оксиген-транспортної функції крові риби.
3. За введення коропам у складі 3%-ої крохмальної суспензії препарату «Флюмек» дозою 20 мг/кг маси риби разом з підвищенням фагоцитарного числа констатовано зростання на 19,9 % вмісту ЦІК, що вказує на антигенне навантаження на організм риби.
4. Препарат «Флюмек» істотно не впливав на кількість Т-лімфоцитів (активних і теофілін-чутливих) та В-лімфоцитів крові та їх функціональну активність. Водночас пероральне введення коропам препарату дозою 20 мг/кг маси риби спричиняло зменшення у крові кількості загальних і теофілін-резистентних Т-лімфоцитів. При цьому встановлено зниження їх функціональної активності за рахунок

перерозподілу рецепторного апарату (збільшення кількості неактивних і зменшення низькоавідних їх форм).

Основні результати досліджень, які описані у цьому підрозділі, опубліковані у наступних працях [76, 79].

3.4. Вплив антибактеріального препарату «Флюмек» та його комплексу з насінням розторопші плямистої на активність імунного й антиоксидантного захисту у коропів, уражених аеромонозом

Метою другого досліду було з'ясування впливу антибактеріального препарату «Флюмек» самостійно та в комплексі з насінням розторопші плямистої (*Silybum marianum*) на інтенсивність процесів ПОЛ й активність ензимів системи антиоксидантного захисту, гематологічні показники, стан природного й адаптивного імунітету у здорових і хворих аеромонозом коропів. Для виконання цього завдання було сформовано чотири групи дволітки коропа по 5 особин у кожній. Риби I групи були клінічно здорові, II-IV групи становили клінічно хворі на аеромоноз риби. Перша група – контрольна, клінічно здорова риба отримувала 3%-у крохмальну суспензію, друга група – хвора аеромонозом риба, отримувала лише 3%-у крохмальну суспензію, третій групі – через зонд упродовж 7 днів вводили антибактеріальний препарат «Флюмек» з розрахунку 10 мг/кг маси риби у складі 3%-ї крохмальної суспензії, четвертій групі – окрім аналогічної дози антибактеріального препарату задавали ще 5 % меленого насіння розторопші плямистої (*Silybum marianum*).

В літературі наявні дані про те, що використання розторопші плямистої у дозі 5 % проявляє активуючий вплив на антиоксидантну систему коропа, також констатовано позитивний вплив на природні механізми захисту, що, в свою чергу, забезпечить високий рівень імунного потенціалу організму за ураження бактеріальним аеромонозом. При цьому, менша доза розторопші,

зокрема 1 %, суттєво не впливала на вказані показники, а введення більшої дози – 10 % їх знижувало [36, 37].

3.4.1. Вплив препарату «Флюмек» і його комплексу з насінням розторопші плямистої на вміст загального протеїну та співвідношення окремих його фракцій у крові коропів, уражених аеромонозом. Фізіологічний стан риб та їх резистентність до захворювань значною мірою характеризуються вмістом загального протеїну та співвідношенням окремих його фракцій. Це пояснюється широким спектром біологічної дії сироваткових протеїнів, зокрема їх пластичною, транспортною і захисною роллю, а також ензиматичними властивостями деяких їх фракцій. Вміст загального протеїну і співвідношення його фракцій у сироватці крові характеризують ступінь реактивності коропа, дозволяють оцінити стан обміну протеїнів і рівень їх синтезу в організмі.

Проведені дослідження показали (табл. 3.20), що захворювання коропів аеромонозом призводить до підвищення вмісту загального протеїну у сироватці крові.

Таблиця 3.20

Вміст загального протеїну та співвідношення окремих його фракцій у сироватці крові досліджуваних коропів за дії препарату «Флюмек» і його комплексу з насінням розторопші плямистої, % ($M \pm m$, $n = 3-5$)

Показники	Група риб			
	I група	II група	III група	IV група
Білок, г/л	41,22±3,24	44,09±4,96	45,22±2,27	43,66±2,58
Альбуміни	54,03±2,69	37,95±2,83*	37,86±1,53*	38,34±0,87*
α-глобуліни	20,37±1,44	19,88±1,98	21,53±0,96	22,25±0,88
β-глобуліни	16,30±0,65	30,43± 4,12*	31,68±2,13**	29,08±0,97**
γ-глобуліни	9,30±0,17	11,74±0,69 *	9,06±0,90	10,32±0,84

Найбільшу концентрацію загального протеїну зафіксовано у сироватці крові коропів другої і третьої груп, проте різниці стосовно контрольної були не

вірогідні. Відомо, що підвищення загального протеїну у крові є маркером інфекційних захворювань. Ймовірно, дія збудників захворювання зумовлює загальний вплив на організм коропів і, зокрема, посилює метаболічні процеси у печінці, внаслідок чого стимулюється синтетична (протеїн-синтезуюча) функція гепатоцитів. При цьому необхідно зауважити, що у сироватці крові коропів, яким разом із антибактеріальним препаратом «Флюмек» задавали 5 % насіння розторопші плямистої, зафіксовано тенденцію до зниження вмісту загального протеїну.

При дослідженні фракційного складу протеїнів сироватки крові (табл. 3.20) привертає увагу зменшення в 1,5 разу ($p < 0,05$) вмісту альбумінів у хворих риб порівняно зі здоровими. При цьому у коропів другої групи, стосовно контрольної, зафіксовано зростання рівня β -глобулінів у 1,9 разу ($p < 0,05$) і γ -глобулінів – у 1,3 разу ($p < 0,05$). Результати цих досліджень свідчать, що у коропів при захворюванні на аеромоноз певною мірою зменшується білоксинтезувальна функція печінки, яку пов'язують з вмістом альбумінів. Зростання рівня β - і γ -глобулінів вказує на стимулювальний вплив чинників захворювання на синтез металотранспортуючих протеїнів і гуморальні фактори імунітету організму коропів, а також про зростання напруги імунної системи, оскільки основну кількість протеїнів вказаної фракції складають імуноглобуліни класів А, G та М, які відносяться до антитіл (Маслянко Р. П., 1999).

З наведених у таблиці 3.20 даних бачимо, що у коропів, яким застосовували антибактеріальний препарат «Флюмек», а також вказаний препарат разом із насінням розторопші плямистої, різниці фракційного складу протеїнів стосовно особин контрольної групи були подібними. Ці дані свідчать, що застосування коропам досліджуваних препаратів істотно не впливало на співвідношення фракційного складу протеїнів сироватки крові.

Отже, захворювання коропів на аеромоноз спричиняє інгібуючий вплив на білоксинтезувальну функцію печінки, зменшує вміст альбумінів, призводить до підвищення у крові вмісту загального протеїну, β - і γ -глобулінів, що вказує

на зростання напруги імунної системи. Констатовано відсутність істотного впливу досліджуваних препаратів на вміст загального протеїну і співвідношення його фракцій у сироватці крові хворих на аеромоноз коропів.

3.4.2. Рівень окиснювального пошкодження протеїнів, інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ензимів в організмі коропів, уражених аеромонозом та за лікування препаратом «Флюмек». Згідно сучасних уявлень, ключове положення у патогенезі інфекційних захворювань риб займає, з одного боку, зниження їх резистентності, а з іншого – посилення вільнорадикальних процесів в їхньому організмі. Це призводить до порушення низки метаболічних процесів і деструкції клітинних мембран та органел вільними кисневими радикалами (активними формами кисню), які утворюються в процесі аеробного метаболізму, внаслідок зниження активності антиоксидантної системи [14].

З наведених у таблиці 3.21 даних бачимо, що вміст альдегідних і кетонових похідних окиснювальної модифікації протеїнів у крові коропів, хворих на аеромоноз, вірогідно більший, ніж в особин контрольної групи.

Таблиця 3.21

Рівень окиснювального пошкодження протеїнів у крові досліджуваних коропів за дії препарату «Флюмек» і його комплексу з насінням розторопші плямистої ($M \pm m$, $n = 4$)

Показники	Група риб			
	I група	II група	III група	IV група
ОМП ₃₇₀ , нмоль/мл	19,6 ± 0,08	24,6 ± 1,27*	20,2 ± 0,25 °	18,4 ± 0,74 °
ОМП ₄₃₀ , нмоль/мл	24,04 ± 0,35	27,4 ± 0,86*	25,5 ± 0,22 °	22,2 ± 1,09 °

Примітка. Тут і надалі різниці статистично вірогідні порівняно до риб I контрольної групи * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$; різниці статистично вірогідні порівняно до риб II групи ° – $p < 0,05$, °° – $p < 0,01$, °°° – $p < 0,001$

Введення коропам досліджуваних препаратів спричинило зменшення вмісту продуктів окиснювального пошкодження протеїнів. Зокрема, вміст

ОМП₃₇₀ і ОМП₄₃₀ у крові риб третьої та четвертої дослідних груп був відповідно в 1,2 ($p<0,05$) і 1,3 рази ($p<0,05$) та в 1,1 ($p<0,05$) і 1,2 рази ($p<0,05$) менший, ніж у хворої на аеромоноз риби. Вміст продуктів окиснювального пошкодження протеїнів у крові коропів дослідних груп був на рівні контрольної. Ці дані свідчать про нормалізуючий вплив досліджуваних препаратів на вміст альдегідних і кетонів похідних окиснювальної модифікації протеїнів. При цьому ці процеси були виражені більшою мірою в організмі коропів четвертої групи, яким разом з препаратом «Флюмек» застосовували насіння розторопші плямистої.

Подібні зміни, тільки виражені більшою мірою, зафіксовано при дослідженні інтенсивності процесів ПОЛ у крові коропів (табл. 3.22). Зокрема, констатовано вірогідно вищий рівень продуктів ПОЛ у плазмі крові хворих коропів щодо клінічно здорової риби. При цьому вміст гідроперекисів ліпідів і ТБК-активних продуктів у плазмі крові коропів третьої та четвертої груп був відповідно в 1,2 і 1,5 ($p<0,001$) рази та в 1,2 ($p<0,01$) і 1,4 рази ($p<0,001$) менший, ніж у хворої риби, що вказує на інгібуючий вплив досліджуваних препаратів на вміст проміжних і кінцевих продуктів ПОЛ.

Таблиця 3.22

Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у плазмі крові досліджуваних коропів за дії препарату «Флюмек» і його комплексу з насінням розторопші плямистої ($M \pm m$, $n = 4$)

Показники	Група риби			
	I група	II група	III група	IV група
Гідроперекиси ліпідів, одЕ/мл	$0,9 \pm 0,13$	$1,7 \pm 0,07^{**}$	$1,5 \pm 0,11^{*}$	$1,1 \pm 0,05^{ooo}$
ТБК-активні продукти, нмоль/мл	$2,4 \pm 0,08$	$3,7 \pm 0,03^{***}$	$3,1 \pm 0,11^{***oo}$	$2,6 \pm 0,11^{ooo}$

Таким чином, результати проведених досліджень показали, що введення хворим на аеромоноз коропам досліджуваних препаратів зумовлює зниження у

плазмі крові інтенсивності процесів ПОЛ і ОМП. Ці зміни були виражені більшою мірою у крові коропів за умов застосування препарату «Флюмек» разом з насінням розторопші плямистої.

При дослідженні вмісту продуктів ПОЛ у гепатопанкреасі хворих коропів виявлено подібні за напрямом зміни (табл.3.23). Зокрема вміст дієнових конюгатів і ТБК-активних продуктів у хворих риб другої групи був відповідно у 2,6 ($p<0,01$) і у 2,5 разу ($p<0,01$) більший, ніж в особин контрольної групи. Ці дані вказують про посилення інтенсивності процесів ПОЛ не тільки у крові, але і в досліджуваних органах риб за дії чинників захворювання.

З наведених у таблиці 3.23 даних бачимо, що вміст дієнових конюгатів, початкових продуктів ПОЛ, у гепатопанкреасі коропів третьої і четвертої груп був на рівні особин контрольної групи. Вміст ТБК-активних продуктів у гепатопанкреасі коропів, яким задавали лише антибактеріальний препарат, був у 1,6 разу менший, ніж у хворої риби. При цьому у коропів четвертої групи, яким застосовували антибактеріальний препарат і насіння розторопші плямистої, вміст ТБК-активних продуктів у гепатопанкреасі коропів був у 1,8 разу ($p<0,05$) менший, ніж у хворих риб. Водночас вміст кінцевих продуктів ПОЛ у коропів третьої і четвертої груп був вірогідно більший, ніж у контрольній.

Таблиця 3.23

Вміст продуктів ПОЛ у гепатопанкреасі досліджуваних коропів за дії препарату «Флюмек» і його комплексу з насінням розторопші плямистої ($M \pm m$, $n=4$)

Показники	Група риб			
	I група	II група	III група	IV група
Дієнові конюгати, нмоль /мг протеїну	0,44 $\pm$ 0,14	1,16 $\pm$ 0,14*	0,68 $\pm$ 0,06	0,67 $\pm$ 0,02
ТБК-активні продукти, нмоль/мг протеїну	1,27 $\pm$ 0,11	3,19 $\pm$ 0,45**	2,00 $\pm$ 0,24*	1,82 $\pm$ 0,12 ° *

Отже, введення розторопші як потужного детоксикуючого чинника, разом із антибактеріальним препаратом «Флюмек» дозволило знизити вміст ТБК-активних продуктів та дієнових конюгатів у гепатопанкреасі коропів, уражених аеромонозом. Такий вплив розторопші вказує на здатність біологічно активних компонентів у її складі елімінувати активні форми кисню та знижувати інтенсивність їх накопичення.

Антиоксидантна система забезпечує адаптаційну стійкість організму в цілому та регулює реакції ПОЛ завдяки функціонуванню системи ферментативних і неферментативних механізмів контролю за вмістом активних форм кисню, вільних радикалів та продуктів пероксидації ліпідів. Її порушення призводить до розвитку в риб різноманітних патологій, обумовлених окисненням у ліпідах клітин поліненасичених жирних кислот активними формами кисню [97].

Як бачимо з даних, наведених у таблиці 3.24, захворювання коропів на аеромоноз не спричиняло вірогідних змін в активності досліджуваних ензимів.

Таблиця 3.24

**Активність антиоксидантних ензимів у гепатопанкреасі
досліджуваних коропів за дії препарату «Флюмек» і його комплексу з
насінням розторопші плямистої ($M \pm m$, $n=4$)**

Показники	Група риб			
	I група	II група	III група	IV група
Каталаза, Мкмоль H_2O_2 /хв. х мг протеїну	46,90±0,23	48,11±0,44	50,92±1,17*	52,77±0,61 ^{o***}
СОД, Ум. Од/хв. мг протеїну	4,49±0,56	3,36±0,20	3,09±0,29	3,86±0,28

Водночас у гепатопанкреасі хворих коропів зафіксовано тенденції до підвищення каталазної і зниження супероксиддисмутазної активності. Разом з цим у гепатопанкреасі коропів третьої і четвертої груп каталазна активність

була відповідно на 8,6 ($p < 0,05$) і 12,5 % ($p < 0,001$) вища, ніж в особин контрольної групи. Зміни супероксиддисмутазної активності у гепатопанкреасі коропів дослідних груп стосовно контрольної були виражені меншою мірою. Заслугує на увагу виявлена тенденція до підвищення супероксиддисмутазної активності у гепатопанкреасі коропів, яким застосовували антибактеріальний препарат і розторопшу плямисту.

Отже, проведені дослідження показали, що захворювання коропів на аеромоноз призводить до підвищення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів у гепатопанкреасі та суттєво не впливає на каталазну активність. При цьому пероральне введення хворим коропам досліджуваних лікувальних препаратів спричиняло інгібуючий вплив на інтенсивність процесів ПОЛ й стимулювальний – на активність ензимів системи антиоксидантного захисту. Вказаний вплив був виражений більшою мірою у гепатопанкреасі коропів, яким задавали препарат «Флюмек» і насіння розторопші плямистої. Такий ефект імовірно обумовлений комплексною адитивною дією антибіотика і розторопші плямистої. Антибактеріальний препарат з одного боку проявляє бактерицидні та бактеріостатичні властивості, а з іншого – розторопша активує імунні механізми захисту [89], і тим самим зменшує антигенне навантаження на організм, що сприяє зниженню вільнорадикальних процесів. Введення розторопші, як потужного детоксикуючого чинника у комплексі з антибіотиком спричинило подвійний ефект і дозволило більшою мірою нормалізувати вміст продуктів ПОЛ та ОМП, що вказує на здатність біологічно активних компонентів у її складі елімінувати активні форми кисню та знижувати інтенсивність їх накопичення. Крім цього, унікальність розторопші полягає ще й у тому, що вона в досить великій кількості концентрує в організмі Мідь і Селен. Як відомо Мідь входить до активного центру потужного ензиму – супероксиддисмутази, а Селен – глутатіонпероксидази та виявляє антиоксидантні властивості. Більше того, у складі розторопші крім поліненасичених жирних кислот і біологічно активних

речовини, присутні вітаміни А та Е, що також володіють антиоксидантними властивостями.

3.4.3. Вплив препарату «Флюмек» і його комплексу з насінням розторопші плямистої на кількість та функціональну активність Т- і В-лімфоцитів крові коропів, уражених аеромонозом. З даних літератури відомо, що стан системи антиоксидантного захисту значною мірою впливає на формування імунної відповіді організму, особливо на функціональну активність імунокомпетентних клітин [127]. З даних, наведених у таблиці 3.25 бачимо, що захворювання коропів на аеромоноз призводить до зменшення ($p<0,05$) загальної кількості Т-лімфоцитів крові. При цьому зафіксовано зростання ($p<0,01$) кількості «нульових», недиференційованих у функціональному відношенні лімфоцитів та зменшення ($p<0,01$) ТЕ-РУЛ з низькою щільністю рецепторів у порівнянні з їх кількістю у крові риб контрольної групи. Подібні зміни, тільки виражені меншою мірою, виявлено у крові коропів другої групи, яким задавали антибактеріальний препарат.

Таблиця 3.25

Відносна кількість Т-загальних лімфоцитів та їх окремих субпопуляцій у крові досліджуваних коропів за дії препарату «Флюмек» і його комплексу з насінням розторопші плямистої ($M\pm m$, $n=4$)

Показники ТЕ-РУЛ	Група риб			
	I група	II група	III група	IV група
0	66,92±0,67	70,75±0,55**	70,25±0,29**	64,75±0,55*
3-5	24,25±0,55	20,75±0,55**	23,30±0,33	25,00±0,47
6-10	7,33±0,41	7,00±0,82	5,75±0,55	8,50±0,33
M	1,5±0,29	1,25±0,29	0,50±0,33	1,75±0,29
%	31,33±0,41	29,00±0,70*	29,25±0,29**	35,25±0,55**

Так, на тлі вірогідного зменшення загальної кількості Т-лімфоцитів у крові коропів цієї групи стосовно контрольної, збільшувалося число їх

неактивних форм. Натомість кількість ТЕ-РУЛ з низькою щільністю рецепторів була на рівні особин контрольної групи. Ці дані свідчать, що введення хворим на аеромоноз коропам досліджуваного антибактеріального препарату істотно не впливало на загальну кількість Т-лімфоцитів крові. Водночас констатовано нормалізуючий вплив препарату «Флюмек» на кількість низькоавідних ТЕ-РУЛ.

Протилежні за напрямом зміни виявлено у крові коропів четвертої групи. Так, введення хворим на аеромоноз коропам препарату «Флюмек» разом з меленим насінням розторопші спричиняло збільшення ($p<0,01$) загальної кількості ТЕ-РУЛ стосовно особин контрольної групи. Вказані зміни у крові коропів цієї групи відбувалися на тлі зменшення ($p<0,05$) кількості неактивних ТЕ-РУЛ. При цьому кількість ТЕ-РУЛ з низькою і середньою щільністю рецепторів була на рівні особин контрольної групи. Результати цих досліджень вказують на оптимізуючий вплив розторопші на кількість і функціональну активність Т-лімфоцитів крові.

З даних, наведених у таблиці 3.26 і 3.27 бачимо, що кількість Т-активних і теофілінрезистентних Т-лімфоцитів та їх окремих субпопуляцій у крові дослідних груп була на рівні, виявлених в особин контрольної групи. Ці дані свідчать про відсутність суттєвого впливу чинників цього захворювання, а також досліджуваних препаратів на кількість і функціональну активність вказаних популяцій імунокомпетентних клітин.

Таблиця 3.26

Відносна кількість Т-активних лімфоцитів та їх окремих субпопуляцій у крові досліджуваних коропів за дії препарату «Флюмек» і його комплексу з насінням розторопші плямистої ($M\pm m$, $n=4$)

Показники ТА-РУЛ	Група риб			
	I група	II група	III група	IV група
0	70,25±1,19	70,75±0,23	71,25±0,55	69,75±0,55
3-5	24,25±0,55	23,75±0,55	23,75±0,55	24,75±0,55
6-10	4,75±0,55	5,50±0,25	4,50±0,33	5,50±0,33
M	0,75±0,29	0,75±0,29	0,50±0,15	0
%	29,75±1,19	29,25±0,29	28,75±0,55	30,25±0,55

Результати цих досліджень узгоджуються з даними літератури. Відомо, що одним з основних критеріїв стійкості коропів до аеромонад може бути стабільність рівня числа лімфоцитів, відсоткового і кількісного числа імунокомпетентних клітин у крові при підвищенні рівня Т-лімфоцитів і надійному гуморальному захисті [118].

Таблиця 3.27

Відносна кількість Th-РУЛ та їх окремих субпопуляцій у крові досліджуваних коропів за дії препарату «Флюмек» і його комплексу з насінням розторопші плямистої ($M \pm m$, $n=4$)

Показники Th-РУЛ	Група риб			
	I група	II група	III група	IV група
0	77,0 $\pm$ 0,25	76,25 $\pm$ 0,29	76,75 $\pm$ 0,87	76,00 $\pm$ 0,67
3-5	17,67 $\pm$ 0,41	19,00 $\pm$ 0,47	18,75 $\pm$ 0,87	19,50 $\pm$ 0,75
6-10	5,33 $\pm$ 0,41	4,75 $\pm$ 0,29	4,50 $\pm$ 0,33	4,50 $\pm$ 0,33
M	0	0	0	0
%	23,5 $\pm$ 0,75	23,75 $\pm$ 0,29	23,25 $\pm$ 0,87	24,00 $\pm$ 0,67

Дослідження показали, що кількість теофілін-чутливих Т-лімфоцитів у крові хворих на аеромоназ коропів була в 1,6 ($p < 0,01$) разу менша, ніж в особин контрольної групи (табл. 3.28). Введення коропам досліджуваних препаратів викликало збільшення у крові кількості теофілін чутливих Т-лімфоцитів, особливо у коропів четвертої групи, яким застосовували антибактеріальний препарат разом з насінням розторопші.

Ці дані свідчать про імуносупресивний вплив чинників цього захворювання на кількість загальних і теофілін чутливих Т-лімфоцитів крові. При цьому констатовано позитивний вплив досліджуваних препаратів на Т-клітинну ланку специфічного захисту організму.

Таблиця 3.28

Відносна кількість Ts-лімфоцитів та імунорегуляторний індекс у крові досліджуваних коропів за дії препарату «Флюмек» та його комплексу з насінням розторопші плямистої ($M \pm m$, $n=4$)

Показники	Група риб			
	I група	II група	III група	IV група
Т-супресори, %	8,33±0,41	5,25±0,55**	6,50±0,75	11,25±0,99*
ІРІ	2,82±0,55	4,65±0,58	3,70±0,59	2,13±0,25

Відомо, що визначення імунорегуляторного індексу (табл. 3.28), як відношення між теофілін-резистентними і теофілін-чутливими лімфоцитами крові використовується для оцінки лімфоцитарної функції імунокомпетентних клітин у нормі та за патології. При дослідженні ІРІ зафіксовано тенденцію до його підвищення у хворих аеромонозом коропів, яких не піддавали лікуванню. Подібні зміни, тільки виражені меншою мірою, констатовано у коропів третьої групи, яким задавали антибактеріальний препарат «Флюмек». Натомість у коропів четвертої групи, яким застосовували поєднаний вплив антибактеріального препарату і насіння розторопші, цей показник був на рівні особин контрольної групи.

При аналізі даних, наведених у таблиці 3.29, привертають увагу вірогідні різниці у кількості В-лімфоцитів у крові хворих коропів, яких не піддавали лікуванню.

Таблиця 3.29.

Відносна кількість В-лімфоцитів (ЕАС-РУЛ) у крові досліджуваних коропів за дії препарату «Флюмек» та його комплексу з насінням розторопші плямистої ($M \pm m$, $n=4$)

В-лімфоцити (ЕАС-РУЛ)	Група риб			
	I група	II група	III група	IV група
0	71,0±0,82	74,75±0,55***	73,50±1,00	70,00±0,82
3-5	24,0±0,33	21,00±0,47***	22,00±0,82*	25,00±0,47
6-10	5,0±0,00	4,25±0,29	4,50±0,33	5,00±0,47
М	0	0	0	0
%	29,00±0,82	25,25±0,55***	26,50±1,00	30,00±0,82

Так, загальна кількість В-лімфоцитів у крові коропів другої групи була в 1,2 ($p < 0,001$) разу менша, ніж у риб контрольної групи. При цьому у крові риб даної групи виявлено більшу ($p < 0,001$) кількість «нульових» і меншу ($p < 0,001$) низькоавідних ЕАС-РУЛ. Ці дані свідчать про те, що захворювання коропів на аеромоноз призводить до зменшення кількості В-лімфоцитів крові та зниження їх функціональної активності.

Введення коропам дослідних груп антибактеріального препарату і, особливо за умов поєднаного його застосування з меленим насінням розторопші плямистої, спричинило нормалізуючий вплив на кількість ЕАС-РУЛ і їх функціональну активність. Про що свідчить відсутність вірогідних різниць досліджуваних показників у коропів четвертої групи стосовно контрольної.

Загалом, отримані результати досліджень свідчать, що активність імунної системи у коропів при захворюванні на асоційовану бактеріальну форму аеромонозу знижується внаслідок зменшення кількості Т-лімфоцитів (загальних і теофілінчутливих) та В-лімфоцитів. При цьому пригнічується їх функціональна активність за рахунок перерозподілу авідності рецепторного апарату імунокомпетентних клітин. Застосовані препарати спричиняли нормалізуючий вплив на кількість і функціональну активність вказаної популяції імунокомпетентних клітин, особливо за умов поєднаного застосування антибактеріального препарату з меленим насінням розторопші плямистої.

3.4.4. Визначення антимікробної активності препарату «Флюмек».

Чутливість мікрофлори біоматеріалу до антибіотиків встановлювали методом дифузії в агар з використанням стандартних дисків з антибіотиками та середовища Мюллера-Хінтона, виробництва *HiMedia Laboratories Pvt Ltd*. Для визначення чутливості мікроорганізмів до флюмеквіну готували стерильні паперові диски, які просочували розчином препарату «Флюмек» так, щоб диск

містив 50 мкг флюомеквіну. Результати тесту на чутливість інтерпретували згідно Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals [211].

Результати тесту на чутливість біоматеріалу до антибіотиків, виконаного диско-дифузійним методом, наведені у таблиці 3.30.

Таблиця 3.30

Чутливість мікрофлори біоматеріалу хворих на аеромоноз коропів до антибіотиків ($M \pm m$, $n=5$)

Антибіотик	Вміст в диску, мкг	Шкіра		Нирки		Печінка	
		діаметр зони інгібування, мм	рівень чутливості	діаметр зони інгібування, мм	рівень чутливості	діаметр зони інгібування, мм	рівень чутливості
Окситетрациклін	30 мкг	19,4 $\pm$ 1,5	пЧ	25,6 $\pm$ 1,3	Ч	27,8 $\pm$ 1,2	Ч
Амоксицилін	10 мкг	-	Р	-	Р	-	Р
Флуорфенікол	30 мкг	22,2 $\pm$ 1,2	Ч	22,2 $\pm$ 1,2	Ч	21,2 $\pm$ 2,0	Ч
Хлортетрациклін	30 мкг	23,2 $\pm$ 1,1	Ч	29 $\pm$ 1,8	Ч	30 $\pm$ 1,3	Ч
Неоміцин	10 мкг	14 $\pm$ 1,2	пЧ	15,8 $\pm$ 1,4	пЧ	16,8 $\pm$ 0,8	пЧ
Тилозин	15 мкг	-	Р	-	Р	-	Р
Лінкоміцин	10 мкг	-	Р	-	Р	-	Р
Колістин	10 мкг	-	Р	-	Р	-	Р
Триметоприм	5 мкг	23,8 $\pm$ 1,4	Ч	22 $\pm$ 1,6	Ч	23,2 $\pm$ 1,8	Ч
Флюмек (флюомеквін)	50 мкг	27,2 $\pm$ 1,5	Ч	30 $\pm$ 1,6	Ч	30,4 $\pm$ 1,1	Ч

Примітки: 1) «Р» – мікрофлора резистентна; «пЧ» – мікрофлора помірно чутлива; «Ч» – мікрофлора чутлива;

2) для флюомеквіну: ≥ 20 мм – мікрофлора чутлива; 19-17 мм – мікрофлора помірно чутлива; ≤ 16 мм – мікрофлора чутлива.

Отже, результати тесту показали високу чутливість мікроорганізмів до флюомеквіну, тетрациклінам, флуорфеніколу і триметоприму, помірну чутливість до неоміцину і резистентність – до амоксициліну, тилозину, лінкоміцину і колістину.

Ефективність лікування бактеріальних інфекцій у ветеринарній медицині перш за все залежить від правильного вибору антибактеріального хіміотерапевтичного засобу. Показником ефективності антимікробного препарату є рівень бактеріостатичної активності його діючої основи.

Методом серійних розведень у рідкому поживному середовищі визначали мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) флюмеквіну в препараті «Флюмек» для ізолятів *Aeromonas hydrophila*. Для цього готували розведення препарату з такими концентраціями флюмеквіну: 250; 125; 62,5; 31,5; 16,0; 8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25 мкг/мл. Отримані значення МІК флюмеквіну інтерпретували наступним чином: $\text{МІК} \leq 2$ мкг/мл – штам чутливий; $\text{МІК} = 4$ мкг/мл – штам помірно чутливий; $\text{МІК} \geq 8$ мкг/мл – штам резистентний.

Відомо, що бактеріостатична дія – це тип антибактеріальної дії хімічних речовин (антибактеріальних засобів), що характеризується затримкою росту і розмноженням бактерій, тобто спричинює бактеріостаз. Результати визначення рівня бактеріостатичної активності препарату «Флюмек» по відношенню до ізолятів *Aeromonas hydrophila* наведені у таблиці 3.31.

Згідно отриманих значень МІК флюмеквіну усі досліджувані ізоляти *Aeromonas hydrophila* були чутливими до препарату «Флюмек». Рівень бактеріостатичної активності флюмеквіну коливався від 1,0 до 2,0 мкг/мл (в середньому 1,40 мкг/мл).

Отримані результати дослідження антимікробної чутливості польових штамів *Aeromonas hydrophila*, виділених від хворої на аеромоноз риби сімейства коропових, показали, що зберігається високий рівень чутливості аеромонад до антибіотиків фторхінолонового ряду, у тому числі до флюмеквіну, діючої речовини антибактеріального препарату для застосування у ветеринарній медицині — «Флюмек».

Таблиця 3.31

Мінімальні інгібуючі концентрації флюомеквіну для ізолятів *Aeromonas hydrophila* (n=5)

Розведення, мкг/мл	Ізоляти				
	1	2	3	4	5
250	—	—	—	—	—
125	—	—	—	—	—
62,5	—	—	—	—	—
31,5	—	—	—	—	—
16,0	—	—	—	—	—
8,0	—	—	—	—	—
4,0	—	—	—	—	—
2,0	—	—	—	—	—
1,0	—	+	+	—	—
0,5	+	+	+	+	+
0,25					
МІК, мкг/мл	1,0	2,0	2,0	1,0	1,0

Примітка. Позначка «—» - ріст бактерій відсутній (бульйон прозорий); «+» - присутній ріст бактерій (помутніння бульйону).

3.4.5. Застосування антибактеріального препарату «Флюомек» в умовах ставків. З метою вивчення ефективності застосування антибактеріального препарату «Флюомек» при лікуванні хворих на аеромоноз дволіток коропів в умовах ставів було проведено виробничу перевірку науково-дослідної роботи. Виробничу перевірку проводилась на Державному підприємстві дослідному господарстві Львівської дослідної станції Інституту рибного господарства НААН.

Для цього дослідні ставки № 18 та № 19, загальною площею 0,36 га кожен, були зарибнені коропами ураженими аеромонозом. У дослідному ставку № 18 хворим риbam задавали препарат «Флюомек» із розрахунку 150 мг на 1 кг комбікорму, який розчиняли у воді і заливали в кормосуміш до повного поглинання розчину. Лікувальний корм готували в день згодовування рибі та

згодовували протягом 10-ти діб з одноденною перервою між п'ятиденками. Рибам у ставку № 19 задавали корм без препарату (контроль). Температура води у ставках становила 18–21°C. Впродовж всього дослідю проводили спостереження за клінічним станом та поведінкою риб. Через 5 та 10 діб після початку годівлі проведено контрольний облов ставків. На 5-ту добу спостерігали покращення стану риб дослідної групи, а в контрольній групі почалася загибель риби.

При клінічному огляді на 10-ту добу встановлено, що у риб, яким із кормом задавали «Флюмек» – виразки на поверхні тіла заросли сполучною тканиною утворивши рубці (рис. 3.10), коропи були активними, добре споживали корм. У риб контрольної групи (став № 19) виразки на поверхні тіла залишились без змін (рис. 3.11), та спостерігали загибель риби.



*Рис. 3.10. Загоєння виразок у дослідних риб, яким із кормом задавали
«Флюмек»
(став №18)*



Рис. 3.11. Виразки у риб контрольної групи (став № 19)

ВИСНОВКИ:

1. Захворювання коропів на аеромоноз призводить до підвищення у крові вмісту загального протеїну, β - і γ -глобулінів і зниження в 1,5 разу ($p < 0,05$) альбумінів, що вказує на зростання напруги імунної системи. Пероральне введення хворим на аеромоноз коропам препарату «Флюмек» окремо, а також за умов поєднаного його застосуванням разом з насінням розторопші, істотно не впливало на вміст загального протеїну і співвідношення його фракцій у сироватці крові.

2. Констатовано нормалізуючий вплив досліджуваних препаратів на вміст альдегідних і кетонівих похідних окиснювальної модифікації протеїнів, гідроперекисів ліпідів і ТБК-активних продуктів у крові та гепатопанкреасі коропів, хворих на аеромоноз. При цьому пероральне введення хворим коропам досліджуваних лікувальних препаратів спричиняло вірогідне підвищення

каталазної активності. Вказаний вплив був виражений більшою мірою у коропів, яким задавали препарат «Флюмек» і насіння розторопші плямистої.

3. Захворювання коропів на аеромоноз призводить до зменшення загальної кількості Т-лімфоцитів (загальних і теофілінчутливих) та В-лімфоцитів крові ($p < 0,05-0,01$) і пригнічення їх функціональної активності за рахунок перерозподілу авідності рецепторного апарату імунокомпетентних клітин.

4. Введення хворим на аеромоноз коропам досліджуваних препаратів, особливо за умов поєднаного застосування антибактеріального препарату з меленим насінням розторопші плямистої, спричиняло оптимізуючий вплив на кількість Т-лімфоцитів (загальних і теофілінчутливих) і В-лімфоцитів крові та їх функціональну активність.

5. Отримані результати дослідження антимікробної чутливості польових штамів *Aeromonas hydrophila*, виділених від хворої на аеромоноз риби сімейства коропових, показали, що зберігається високий рівень чутливості аеромонад до антибіотиків фторхінолонового ряду, в тому числі до флюмеквіну, діючої речовини антибактеріального препарату «Флюмек».

6. Введення хворим аеромонозом коропам препарату «Флюмек» із розрахунку 150 мг на 1 кг комбікорму, проявляє терапевтичний ефект, зокрема, при клінічному огляді на 10-ту добу встановлено, що у риб, яким із кормом задавали «Флюмек» – виразки на поверхні тіла заросли сполучною тканиною утворивши рубці, коропи були активними, добре споживали корм. У риб контрольної групи виразки на поверхні тіла залишились без змін, та спостерігали загибель риби.

Основні результати досліджень, які описані у цьому підрозділі, опубліковані у наступних працях [75, 80, 81].

3.5. Стан імунного й антиоксидантного захисту у коропів, уражених аеромонозом, та за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін», активованого водним розчином йоду і селену

3.5.1. Активність ензимів системи антиоксидантного захисту, інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів та рівень окиснювального пошкодження протеїнів у коропа за дії препарату «Ентеронормін». Рівновага окисно-відновних процесів є основою нормального функціонування клітин. За фізіологічних умов система реакцій ПОЛ контролюються залученням різних антиоксидантних захисних механізмів. Порушення такого контролю, зокрема за умов захворювання, призводить до інтенсифікації процесів ПОЛ та накопичення в організмі високореакційних молекул, які призводять до ушкоджень структур та функцій клітин.

З наведених у таблиці 3.32 даних бачимо, що згодовування «Ентеронорміну» хворим на аеромоноз дворічкам коропів (Д2) спричиняло зниження інтенсивності процесів пероксидації ліпідів у їхньому організмі. Вміст дієнових кон'югатів, які утворюються переважно на першому етапі ПОЛ, і вміст ТБК-активних продуктів у гепатопанкреасі риб другої дослідної групи, був відповідно в 1,5 і 2,3 разу ($p < 0,05$) менший, ніж у гепатопанкреасі риб контрольної групи. Зменшення вмісту продуктів ПОЛ у гепатопанкреасі дворічок коропів імовірно зумовлене підвищенням активності ензимів антиоксидантного захисту в їх організмі, що буде показано нижче.

Таблиця 3.32

Вміст продуктів ПОЛ у гепатопанкреасі досліджуваних коропів за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін» ($M \pm m$, $n=3$)

Показники	Група риб		
	контрольна	I дослідна	II дослідна
Дієнові конюгати, нмоль /мг протеїну	1,38 $\pm$ 0,20	1,39 $\pm$ 0,14	0,94 $\pm$ 0,15*
ТБК-активні продукти, нмоль/мг протеїну	1,58 $\pm$ 0,19	1,30 $\pm$ 0,08	0,69 $\pm$ 0,10*

Окиснення протеїнів є одним з механізмів регуляції їх розпаду. Активні форми кисню здатні викликати окисну модифікацію протеїнів (ОМП) за умов норми та патології.

З наведених у таблиці 3.33 даних бачимо, що вміст альдегідних (ОМП₃₇₀) і кетонних (ОМП₄₃₀) похідних окиснювальної модифікації протеїнів у крові коропів, яким задавали препарат «Ентеронормін» (Д2), був відповідно в 1,2 ($p<0,001$) і 3,1 ($p<0,01$) рази менший, ніж у риб контрольної групи. Результати цих досліджень показали, що застосування королам синбіотичного препарату у комплексі з Йодом і Селеном спричиняє інгібуючий вплив на інтенсивність утворення похідних окиснювальної модифікації протеїнів.

Таблиця 3.33

Вміст продуктів окиснювального пошкодження протеїнів у крові досліджуваних коропів за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін» ($M\pm m$, $n=3$)

Показники	Група риб		
	контрольна	I дослідна	II дослідна
ОМП ₃₇₀ , нмоль/мл	19,87±0,28	18,79±0,30*	15,79±0,37***
ОМП ₄₃₀ , нмоль/мл	15,53±1,59	11,61±0,48	5,06±0,83**

При дослідженні впливу синбіотичного препарату на активність ензимів антиоксидантного захисту у гепатопанкреасі привертає увагу підвищення в 1,5 рази ($p<0,05$) супероксиддисмутази активності (табл.3.34).

Таблиця 3.34

Активність антиоксидантних ензимів у гепатопанкреасі досліджуваних коропів за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін» ($M\pm m$; $n=3$)

Показники	Група риб		
	контрольна	I дослідна	II дослідна
Каталаза, Мкмоль H ₂ O ₂ /хв. х мг протеїну	43,06±1,56	45,17±2,96	43,66± 6,56
СОД, Ум. Од/хв. мг протеїну	4,77±0,09	4,42±0,41	7,25±0,69*

Натомість каталазна активність у гепатопанкреасі коропів дослідних груп була на рівні контрольної. Ці дані свідчать про стимулювальний вплив синбіотичного препарату «Ентеронормін» на активність ключового ензиму антиоксидантного захисту — супероксиддисмутази. Підвищення супероксиддисмутазної активності у гепатопанкреасі коропів за дії досліджуваного синбіотичного препарату можна пояснити комплексною адитивною дією культури корисних мікроорганізмів, а також Йоду і Селену.

3.5.2. Активність природних механізмів захисту організму коропа при застосуванні синбіотичного препарату «Ентеронормін». З наведених у таблиці 3.35 даних бачимо, що захворювання коропів аеромонозом призводить до вірогідного зростання вмісту циркулюючих імунних комплексів і лізоцимної активності сироватки крові. Відомо, що утворення імунних комплексів в організмі є результатом специфічної взаємодії антигенів з антитілами. Циркулюючі імунні комплекси відносять до високомолекулярних білкових сполук, структура та функція яких залежить від фізико-хімічних та біологічних властивостей антигену й антитіла. Як бачимо з даних таблиці 3.35, вміст ЦІК у сироватці крові коропів, хворих асоційованою формою аеромонозу, збільшився в 1,3 разу ($p < 0,01$) порівняно з їх рівнем у риб контрольної групи. Застосування коропам другої дослідної групи 3%-ї крохмальної суспензії і препарату «Ентеронормін» спричиняло нормалізуючий вплив на вміст досліджуваних високомолекулярних білкових сполук. Про що вказує зменшення вмісту ЦІК у сироватці крові коропів другої дослідної групи та відсутність вірогідних різниць стосовно контрольної групи.

Лізоцим – універсальний ензим, що має неспецифічну бактерицидну дію [3]. Як низькомолекулярний білок, він має здатність піддавати лізису стінки бактерій, стимулює синтез антитіл і нейтралізує бактеріальні токсини, присутній у сироватці крові, слизі риб, тканинах внутрішніх органів [251]. Найбільша його концентрація виявлена у нирках риб, менша – в селезінці, слизі

шкіри і кишечника. В сироватці крові лізоциму дуже мало, його активність прямо пропорційно пов'язана зі станом імунної системи. У деяких видів риб цей ензим зовсім не знайдений [263].

Таблиця 3.35

Лізоцимна активність і вміст циркулюючих імунних комплексів у крові досліджуваних коропів за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін»
($M \pm m$, $n=4$)

Показники	Група риб		
	контрольна	I дослідна	II дослідна
ЦІК; ммоль/л	42±1,8	58±2,4**	44,2±1,9
ЛАСК, %	30,5±2,4	47,3±1,08**	27,2±1,8

При дослідженні гуморальної ланки неспецифічної резистентності організму коропів, і, зокрема лізоцимної активності сироватки крові, констатовано збільшення ($p < 0,01$) цього показника природного захисту у хворих на аеромоноз риб у порівнянні з контрольною групою. Це ймовірно пов'язано з тим, що титр лізоциму значно залежить від багатьох факторів. Водночас за впливу досліджуваного синбіотичного препарату констатовано зниження ЛАСК до рівня, виявленого в особин контрольної групи, що підтверджує нормалізуючу дію чинників ентеронорміну на гуморальну ланку природної резистентності організму риб.

Імунологічна реактивність організму визначається його здатністю розпізнавати та знешкоджувати генетично чужорідне. Клітинну ланку неспецифічної резистентності організму риб, як і ссавців, характеризує фагоцитарна активність крові. Фагоцитоз — це процес активного поглинання клітинами організму патогенних живих і вбитих мікроорганізмів, а також інших чужорідних часток з наступним перетравленням їх за допомогою внутрішньоклітинних ензимів. Основними клітинами, які беруть участь у процесі фагоцитозу, є нейтрофільні гранулоцити [14].

Проведені дослідження показали, що захворювання коропів асоційованою формою аеромонозу, спричиняло зростання фагоцитарного індексу та фагоцитарного числа на тлі зниження фагоцитарної активності нейтрофілів крові (табл. 3.36). При цьому необхідно зауважити, що фагоцитарний індекс, який характеризує кількість захоплених мікроорганізмів одним активним фагоцитом, у крові хворих коропів був на 21,1 % ($p < 0,05$) більший, ніж у клінічно здорової риби. Результати цих досліджень свідчать, що захворювання коропів асоційованою формою аеромонозу, спричиняє імуносупресивний вплив на фагоцитарну активність нейтрофілів крові, водночас потужність фагоцитозу зростає.

Таблиця 3.36

Показники фагоцитозу гранулоцитів крові у досліджуваних коропів за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін» ($M \pm m; n=4$)

Показники	Група риб		
	контрольна	I дослідна	II дослідна
Фагоцитарна активність, %	40,5 $\pm$ 3,3	38,0 $\pm$ 1,05	39,5 $\pm$ 1,1
Фагоцитарний індекс, од	10,4 $\pm$ 0,4	12,6 $\pm$ 0,6*	11,2 $\pm$ 0,4
Фагоцитарне число, од	4,2 $\pm$ 0,1	4,8 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 0,08

У коропів другої дослідної групи, яким застосовували препарат «Ентеронормін», показники фагоцитозу гранулоцитів крові за значеннями були на рівні контрольної групи, яку становили здорові риби.

Отже, результати проведених досліджень свідчать, що у коропів, уражених аеромонозом, зафіксовано збільшення вмісту циркулюючих імунних комплексів і підвищення лізоцимної активності сироватки крові та зниження показників клітинної ланки неспецифічної резистентності, а саме фагоцитарної активності крові. Таким чином з цих даних можна зробити припущення, що у коропів, хворих на бактеріальну форму аеромонозу, ця ланка захисту функціонально менш активна, ніж у здорових риб. Цей фактор може бути або одним з ведучих у патогенезі їх захворювання аеромонозом, або її наслідком.

Застосування хворим на аеромоноз коропам препарату «Ентеронормін», спричиняло нормалізуючий вплив на досліджувані показники природного захисту. Ці зміни ймовірно зумовлені комплексною адитивною дією молочнокислих бактерій (*Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* та *Bacillus subtilis spp.*) та допоміжних компонентів хітозану та пептону, що є у досліджуваному препараті. Разом з цим препарат проявляє антагоністичну активність до широкого спектру патогенних бактерій і грибів. Активація досліджуваного синбіотичного препарату водним розчином йоду і селену спричиняє підвищення антагоністичної активності мікроорганізмів, що містить препарат «Ентеронормін». Формуючи нормальну мікрофлору, «Ентеронормін» цим стабілізує захисні сили організму коропів. Окрім цього, Йод і Селен підсилюють дію один одного, мають антиоксидантні властивості захищають організм від шкідливих речовин, що утворюються при розпаді токсинів.

3.5.3. Активність Т- і В-клітинної ланки специфічного захисту у коропа за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін». Відомо, що функціональною основою імунної системи ссавців, а також риб є комплекс імунокомпетентних клітин – лімфоцитів, які є носіями імунологічної пам'яті та попередниками антитілоутворюючих клітин. Їх роль значною мірою визначається кількістю Т- і В-лімфоцитів та їх субпопуляцій у периферичній крові риб.

З даних, наведених у таблицях 3.37–3.41 бачимо, що захворювання коропів на аеромоноз призводить до зміни кількості та функціональної активності імунокомпетентних клітин крові.

Зокрема, загальна кількість Т-лімфоцитів (загальних, активних і теофілін-резистентних) у крові коропів, хворих на аеромоноз, була відповідно на 6,3 ($p<0,001$), 4,7 ($p<0,05$) і 7,5 % ($p<0,01$) менша, ніж у клінічно здорової риби. Зменшення кількості вказаних субпопуляцій ефекторних клітин у крові хворих коропів цієї групи відбувалося на тлі збільшення кількості не активних у

функціональному відношенні T_0 -лімфоцитів ($p<0,05-0,001$) та зменшення ($p<0,01$) низькоавідних Т-лімфоцитів.

Таблиця 3.37

Відносна кількість Т-загальних лімфоцитів та їх окремих субпопуляцій у крові досліджуваних коропів за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін» ($M \pm m$, $n=4$)

Показники ТЕ-РУЛ	Група риб		
	контрольна	I дослідна	II дослідна
0	64,00±0,67	70,25±0,55***	65,75±1,59
3-5	29,00±0,47	24,25±0,55**	28,25±0,99
6-10	5,25±0,55	4,25±0,29	4,50±0,33
M	1,5±0,29	1,25±0,29	1,50±0,33
%	36,00± 0,67	29,75±0,55***	34,25±1,59

Ці дані свідчать про пригнічення (експресію) лімфоцитогенезу та функціональної активності імунокомпетентних клітин у крові коропів при захворюванні бактеріальною формою аеромонозу.

Застосування коропам дослідної групи у складі 3%-ї крохмальної суспензії препарату «Ентеронормін» спричиняло нормалізуючий вплив на стан Т-клітинної ланки специфічного захисту. Про що свідчить зростання загальної кількості Т-лімфоцитів, особливо Е-РУЛ і А-РУЛ та підвищення їх функціональної активності (табл.3.37-3.38).

Таблиця 3.38

Відносна кількість Т-активних лімфоцитів та їх окремих субпопуляцій у крові досліджуваних коропів за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін» ($M \pm m$, $n=4$)

Показники ТА-РУЛ	Групи риб		
	контрольна	I дослідна	II дослідна
0	70,25±1,19	75,00±0,82*	71,75±1,19
3-5	24,25±0,55	20,75±0,55**	22,25±0,99
6-10	4,75±0,55	4,00±0,47	5,00±0,47
M	0,75±0,29	0,25±0,29	1,00±0,47
%	29,75±1,19	25,00±0,82*	28,25±1,19

Кількість вказаних субпопуляцій Т-лімфоцитів у крові коропів, яким застосовували досліджуваний препарат, були на рівні особин контрольної групи.

Водночас вплив препарату на кількість теофілін-резистентних Т-РУЛ був виражений меншою мірою (табл.3.39). Про це вказує менша ($p<0,05$) їх загальна кількість у крові коропів другої групи стосовно контрольної. При цьому зафіксовано також меншу ($p<0,05$) кількість теофілін-резистентних Т-РУЛ з низькою щільністю рецепторів.

Таблиця 3.39

Відносна кількість Th-РУЛ та їх окремих субпопуляцій у крові досліджуваних коропів за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін» ($M\pm m$, $n=4$)

Показники Th-РУЛ	Група риб		
	контрольна	I дослідна	II дослідна
0	72,00±1,05	79,50±0,75**	75,50±1,20
3-5	23,25±0,99	15,25±0,99**	19,00±1,05*
6-10	4,75±0,29	5,00±0,47	4,75±0,55
M	0	0,25±0,29	0
%	28,00±1,05	20,50±0,75**	23,50±0,75*

Захворювання коропів бактеріальною формою аеромонозу спричиняло тенденцію до зростання у крові кількості Т-лімфоцитів супресорів (табл. 3.40).

Таблиця 3.40

Відносна кількість Ts-лімфоцитів та імунорегуляторний індекс у крові досліджуваних коропів за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін» ($M\pm m$, $n=4$)

Показники	Група риб		
	Контрольна	I дослідна	II дослідна
Ts, %	8,00±1,25	10,00±0,67	10,50±1,00
IPi	3,71±0,63	2,06±0,18*	2,24 ±0,24

Такі зміни вказують на посилення депресивної дії чинника захворювання на функцію вказаної популяції Т-лімфоцитів у риб. Про що також свідчить

зниження імунорегуляторного індексу у коропів дослідних груп порівняно до контрольної. Про те різниці виявилися вірогідними лише у коропів, яким застосовували лише 3%-у крохмальну суспензію.

Відомо, що активність гуморальної ланки специфічного захисту характеризує кількість у крові В-лімфоцитів та їх функціональна активність. Як бачимо з даних, наведених у таблиці 3.41, загальна кількість ЕАС-РУЛ у крові коропів першої та другої дослідних груп була вірогідно менша, а недиференційованої популяції — більша, порівняно з контрольною. При цьому також у крові риб дослідних груп виявлено вірогідно меншу кількість низькоавідних ЕАС-РУЛ, що свідчить про негативний вплив збудника аеромонозу на активність гуморальної ланки специфічного захисту організму коропів.

Таблиця 3.41

Відносна кількість В-лімфоцитів (ЕАС-РУЛ) у крові досліджуваних коропів за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін» ($M \pm m$, $n=4$)

Показники ЕАС-РУЛ	Група риб		
	контрольна	I дослідна	II дослідна
0	76,25±0,73	79,50±0,33**	79,00±0,47*
3-5	19,00±0,47	16,25±0,73*	16,75±0,55*
6-10	4,75±0,55	4,25±0,55	4,25±0,29
%	23,75±0,73	20,50±0,33**	21,00±0,47*

Застосування королам досліджуваного препарату у складі 3%-ї крохмальної суспензії істотно не вплинуло на кількість ЕАС-РУЛ і їх функціональну активність. Результати цих досліджень свідчать, що дія досліджуваного препарату більшою мірою скерована на Т-клітинну ланку імунітету риб.

Загалом, результати проведених досліджень показали, що захворювання коропів асоційованою бактеріальною формою аеромонозу спричиняє імуносупресивний вплив на стан Т- і В-клітинної ланок специфічного захисту організму риб. Цей вплив характеризувався зменшенням кількості Т- і В-

лімфоцитів та зниженням їх функціональної активності. Застосування хворим коропам препарату «Ентеронормін» проявляло нормалізуючий вплив на загальну кількість і функціональну активність досліджуваних імунокомпетентних клітин, особливо Т-лімфоцитів (Е-РУЛ і А-РУЛ). Про що свідчить збільшення на поверхні Т-лімфоцитів кількості рецепторів, здатних взаємодіяти з більшою кількістю антигенних детермінант, внаслідок чого зростає активність імунної відповіді організму.

Отже, під впливом чинників препарату в імунокомпетентних клітинах коропів проходить реорганізація плазматичних мембран лімфоцитів, особливо Т-лімфоцитів, у бік зміцнення експресії рецепторів плазмолемі, що вказує на розширення рецепторного поля клітини. Ці зміни ймовірно зумовлені комплексною адитивною дією комплексу молочнокислих бактерій (*Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* та *Bacillus subtilis spp.*) та допоміжних компонентів хітозану та пептону, а саме антагоністичною активністю до широкого спектру патогенних бактерій і грибів. Формуючи нормальну мікрофлору, тим самим нормалізує місцевий секреторний імунітет, який за принципом дії «від периферії до центру» позитивно впливає на загальний стан Т- і В-клітинної ланок специфічного захисту організму риб.

ВИСНОВКИ

1. У гепатопанкреасі коропів, яким застосовували досліджуваний синбіотичний препарат, виявлено в 1,5 разу ($p < 0,05$) вищу супероксиддисмутазну активність на тлі зниження 2,3 разу ($p < 0,05$) вмісту ТБК-активних продуктів і 3,1 разу ($p < 0,01$) кетонових похідних окиснювальної модифікації протеїнів.

2. Констатовано імуносупресивний вплив чинників цього захворювання на активність клітинної ланки природних механізмів захисту у досліджуваних риб. Зокрема, у хворих коропів виявлено тенденції до зниження фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів крові. Водночас за цих

умов зафіксовано вірогідне збільшення лізоцимної активності сироватки крові, вмісту циркулюючих імунних комплексів і фагоцитарного індексу.

3. Встановлено реабілітуючу дію синбіотичного препарату «Ентеронормін» на показники клітинної і гуморальної ланок неспецифічної резистентності організму риб, хворих на асоційовану бактеріальну форму аеромонозу.

4. Захворювання короїв асоційованою бактеріальною формою аеромонозу спричиняє імуносупресивний вплив на лімфоцитогенез, стан Т- і В-клітинної ланок специфічного захисту. При цьому зафіксовано зменшення кількості Т- і В-лімфоцитів крові та зниження їх функціональної активності.

5. Застосування коропам дослідної групи у складі 3%-ї крохмальної суспензії препарату «Ентеронормін» спричиняло нормалізуючий вплив на стан Т-клітинної ланки специфічного захисту, проте істотно не вплинуло на кількість ЕАС-РУЛ та їх функціональну активність.

Основні результати досліджень, які описані у цьому підрозділі, опубліковані у наступних працях [77, 82, 87].

РОЗДІЛ 4.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Бактеріальні захворювання є причиною високої смертності як в диких, так і у риб, вирощених в аквакультурі. Не менш поширеними є асоційовані інфекції, які виникають за ураження риб двома або більше генетично різними збудниками, чи зараження вторинними інфекціями, так що два або більше інфекційних збудники діють одночасно в одному організмі. До таких, зокрема, відносять асоційовану інфекцію аеромонозу з сапролегніозом.

У літературі наявні дані з етіології, патогенезу, пошуку способів профілактики та лікування аеромонозу. При цьому існуючі відомості щодо асоційованої інфекції аеромонозу із сапролегніозом фрагментарні та обмежуються лише загальним описом захворювання. Інформації щодо динаміки пероксидних процесів, стану імунної й антиоксидантної систем захисту за асоційованої інфекції аеромонозу та сапролегніозу практично немає. Також слід зазначити, що на даний час у рибництві існує проблема в розробці ефективних препаратів, які можна було б застосовувати за аеромонозу.

З огляду на це актуальним є проведення досліджень, скерованих на вивчення біохімічного профілю крові, системи антиоксидантного захисту й імунного потенціалу у коропів, хворих асоційованим аеромонозом із сапролегніозом, та за умов застосування нових ефективних способів лікування.

У даній роботі на першому етапі досліджено вплив аеромонозу та асоційованої інфекції аеромонозу із сапролегніозом на інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів, активність імунного й антиоксидантного захисту в організмі коропів.

Встановлено, що ураження коропів асоційованою формою аеромонозу з нашаруванням сапролегніозу призводить до зростання продуктів пероксидації в гепатопанкреасі. Зокрема, вміст дієнових кон'югатів, первинного продукту пероксидного окиснення ліпідів, у гепатопанкреасі риб першої і другої дослідних груп був відповідно в 1,2 і 1,4 ($p < 0,05$) разу більший, ніж у риб

контрольної групи. Разом з цим у гепатопанкреасі коропів за асоційованої інфекції виявлено тенденцію до зростання вмісту кінцевого продукту ПОЛ – ТБК-активних продуктів. Ці дані свідчать про більший інгібуючий вплив асоційованої інфекції на інтенсивність процесів ПОЛ в організмі коропів. Подібні зміни вмісту продуктів ПОЛ у гепатопанкреасі та крові коропів зафіксовані при змішаній інвазії ектопаразитами [42, 46], при бактеріальних [114, 132] та вірусних інфекціях [26], за дії важких металів [274].

Дослідження показали, що активність ключових антиоксидантних ензимів – супероксиддисмутази та каталази у гепатопанкреасі коропів дослідних груп значно нища, ніж в особин контрольної групи. Зниження супероксиддисмутазної та каталазної активності у гепатопанкреасі коропів можна розглядати як прояв певного виснаження антиоксидантного потенціалу організму внаслідок поступового пошкодження її компонентів вільними радикалами і продуктами ПОЛ. Ці дані узгоджуються з даними Тушницької Н. Й., що досліджувала функціональний стан системи антиоксидантного захисту та процеси ПОЛ у коропів за асоційованої бактеріальної краснухи [91].

Що стосується бактерицидної активності сироватки крові, яка є інтегральним фактором природної резистентності організму гуморального типу і свідчить про здатність крові до самоочищення, то вона зростає у двох дослідних групах у 1,4 разу ($p < 0,05$). Також встановлено зростання ЛАСК у риб, хворих аеромонозом у 1,2 разу ($p < 0,01$) та у риб, хворих асоційованою інфекцією аеромонозу із сапролегніозом – у 1,3 разу ($p < 0,01$). При дослідженні циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові риб констатовано збільшення ($p < 0,05$) їх вмісту у коропів, уражених аеромонозом, а також уражених аеромонозом асоційованим з сапролегніозом порівняно зі здоровими коропами контрольної групи. ЦІК характеризують ступінь синтезу антитіл в організмі та спрямовані на елімінацію патогенних антигенів.

Отже, захворювання риб аеромонозом, а також асоційованою інфекцією аеромонозу із сапролегніозом спричиняє активуючий вплив на механізми

природного захисту, про що свідчить підвищення показників гуморальної ланки неспецифічної резистентності. Відомо, що показники природної резистентності у риб мають видову та сезонну залежність [71] і змінюються при інфекційних захворюваннях [15, 109, 132].

Констатовано тенденцію до збільшення вмісту загального протеїну у коропів за асоційованої інфекції, разом з цим у риб, хворих аеромонозом цей показник не змінюється, у порівнянні з особинами контрольної групи. При цьому виявлено зменшення ($p < 0,05$) кількості еритроцитів у крові коропів першої та другої дослідних груп, а також зниження концентрації гемоглобіну в крові риб, уражених аеромонозом ($p < 0,05$) та аеромонозом із сапролегніозом ($p < 0,05$), стосовно контрольної групи. Подібні результати одержані при дослідженні гематологічних показників у інших видів риб, уражених аеромонозом, зокрема – палії та паку [11, 136].

Захворювання коропів на аеромоноз та асоційовану інфекцію аеромонозу з сапролегніозом зумовлює імуносупресивний вплив на ефекторну ланку імунної відповіді – зменшується кількість Т-лімфоцитів (загальних і теофілін-чутливих) та знижується функціональна активність ТЕ-РУЛ. Отримані нами результати узгоджуються з даними інших авторів, які вказують, що при ураженні коропа асоційованою бактеріальною формою краснухи зменшується кількість Т-активних лімфоцитів [92, 136].

В імунограмі крові хворих коропів зафіксовано зменшення кількості антигензв'язуючих В-лімфоцитів, а також низькоавідних їх форм за одночасного збільшення неактивних ЕАС-РУЛ. Вказані зміни були виражені більшою мірою у крові коропів, уражених аеромонозом і асоційованою інфекцією аеромонозу та сапролегніозу. Одержані нами результати узгоджуються з даними Е. В. Компанця, який повідомляє про зменшення кількості В-лімфоцитів у крові коропа при захворюванні краснухою, однак дані Тушницької Н. Й. зі співавт. [33, 92], вказують про тенденцію до збільшення загальної кількості В-лімфоцитів при асоційованій бактеріальній формі краснухи.

Загалом, отримані у цьому досліді результати досліджень свідчать, що захворювання коропів асоційованою інфекцією аеромонозу із сапролегніозом призводить до порушення балансу в прооксидантно-антиоксидантній системі гепатоцитів. Зокрема, виявлено збільшення вмісту дієнових кон'югатів і ТБК-активних продуктів ($p < 0,05-0,01$) і зниження каталазної і супероксиддисмутазної активності ($p < 0,05-0,01$), що свідчить про підвищення інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів і зниження антиоксидантного потенціалу організму у хворих риб. При цьому, у крові коропів, уражених аеромонозом та асоційованою інфекцією аеромонозу й сапролегніозу, зафіксовано зниження концентрації гемоглобіну ($p < 0,05$), зменшення кількості Т-лімфоцитів (загальних і теофілін-чутливих) та В-лімфоцитів ($p < 0,05-0,001$) і зниження їх функціональної активності. Натомість виявлено підвищення бактерицидної і лізоцимної активності сироватки крові ($p < 0,05-0,001$) та збільшення вмісту циркулюючих імунних комплексів ($p < 0,05$). Вказані зміни були виражені більшою мірою у крові коропів, уражених аеромонозом і асоційованою інфекцією аеромонозу та сапролегніозу.

Одним з основних рішень боротьби з хворобами в аквакультурі, як і для інших видів тварин, є розумне використання ветеринарних препаратів. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) стверджує, що протимікробні препарати є життєво важливими засобами для лікування бактеріальних інфекцій як у людей, так і у тварин. Аквакультура потребує наявності ефективних протимікробних препаратів, щоб збільшити показники виживання популяції, зменшити втрати від інфекцій та покращити коефіцієнт конверсії корму, адже ці фактори впливають на вирощування риб та інших гідробіонтів.

Тому метою другого етапу досліджень, згідно зазначеної вище схеми, було з'ясування впливу антибактеріального препарату «Флюмек» окремо та у поєднанні з насінням розторопші плямистої (*Silybum marianum*) на інтенсивність процесів ПОЛ й активність ензимів системи антиоксидантного захисту, гематологічні показники, стан природного й адаптивного імунітету у здорових і хворих аеромонозом коропів.

З метою вивчення вказаних питань проведено два досліді. В першому досліді з'ясовували вплив різних доз антибактеріального препарату «Флюмек» на гематологічний профіль, стан системи антиоксидантного захисту й імунного потенціалу у клінічно здорових дволіток коропа.

Проведені дослідження показали, що введення коропам препарату «Флюмек» дозою 10 мг/кг маси риби спричиняло підвищення супероксиддисмутази активності ($p < 0,05$), хоча введення більшої дози препарату, а саме 20 мг/кг маси, істотно не впливало на активність супероксиддисмутази – одного із ключових ензимів системи антиоксидантного захисту в організмі риб. Також встановлено, що на відміну від супероксиддисмутази активності, каталазна активність у гепатопанкреасі коропів при введенні різних доз препарату «Флюмек» практично не відрізнялась за показниками від риб контрольної групи.

Виявлено тенденцію до зниження вмісту дієнових кон'югатів у гепатопанкреасі риб, яким задавали досліджуваний препарат дозою 10 мг/кг маси та 20 мг/кг маси, у порівнянні із особинами контрольної групи, відповідно у 3,3 ($p < 0,05$) та 1,9 ($p < 0,05$) разу. Ці дані свідчать про інгібуючий дозозалежний вплив антибактеріального препарату «Флюмек» на інтенсивність утворення первинних продуктів ПОЛ у гепатопанкреасі коропів. Вміст ТБК-активних продуктів у печінці коропів першої та другої дослідних груп суттєво не відрізнявся від їхнього вмісту в коропів контрольної групи. Відомо, що рівень продуктів ПОЛ у печінці риб є біомаркером, який характеризує її фізіологічний стан за дії різних токсичних речовин і патогенів. Ці дані свідчать про відсутність значного підвищення пероксидних процесів у печінці коропів за дії різних доз досліджуваного антибактеріального препарату «Флюмек», у порівнянні з іншими антибактеріальними препаратами [18, 33].

Досліджувані гематологічні показники, зокрема, кількість еритроцитів та концентрація гемоглобіну у крові коропів дослідних і контрольної груп були в межах нормативних величин для цієї вікової та видової групи риб. Вірогідних змін у кількості еритроцитів і концентрації гемоглобіну у крові коропів

дослідних груп порівняно до контрольної не зафіксовано. Це свідчить про відсутність порушення оксиген-транспортної функції і гемолізу еритроцитів крові риб за дії різних доз досліджуваного антибактеріального препарату.

Водночас у риб, які отримували препарат «Флюмек» дозою 20 мг/кг маси, зафіксовано збільшення рівня ЦІК, що вказує на тенденцію до підвищення антигенного навантаження на організм короїв. Введення короїв препарату «Флюмек» дозою 10 мг/кг маси спричиняло підвищення лізоцимної ($p < 0,05$) і бактерицидної активності сироватки крові. Водночас, застосування більшої дози препарату – 20 мг/кг маси, викликало тенденцію до зниження бактерицидної активності, проте істотно не впливало на лізоцимну активність сироватки крові риб.

Фагоцитарна активність гранулоцитів у крові короїв дослідних груп зростала у порівнянні з особинами контрольної групи, проте різниці були не вірогідні. Фагоцитарний індекс, що характеризує кількість захоплених мікроорганізмів одним активним фагоцитом, показав вищий рівень «перетравлювальної» здатності сегментоядерних нейтрофілів у крові короїв дослідних груп, однак різниці також невірогідні. Разом з цим у крові короїв обох дослідних груп, порівняно до контрольної, зафіксовано більше ($p < 0,05$) значення фагоцитарного числа.

Відомо, що для оцінки резистентності риб до захворювань використовують різноманітні методичні прийоми аналізу структурно-функціонального стану імунної системи. Одним з таких є дослідження кількості і функціональної активності Т- і В-лімфоцитів крові та їхніх регуляторних субпопуляцій [120]. Результати проведених досліджень показали, що пероральне задавання короїв у складі 3%-ої крохмальної суспензії препарату «Флюмек» істотно не впливало на кількість і функціональну активність Т-лімфоцитів (активних і теофілін-чутливих) та В-лімфоцитів крові. Водночас за дії досліджуваного препарату у дозі 20 мг/кг маси риби, зафіксовано зменшення у крові кількості загальних і теофілін-резистентних Т-лімфоцитів. При цьому встановлено зниження їх функціональної активності за рахунок перерозподілу

рецепторного апарату вказаної популяції Т-лімфоцитів крові (збільшення кількості неактивних і зниження низькоавідних їх форм), що вказує на дозозалежний вплив препарату на активність специфічного захисту риб.

Оскільки у попередніх наших дослідженнях було встановлено, що препарат «Флюмек» спричиняє дозозалежний імуносупресивний вплив на окремі ланки природного й адаптивного захисту. З огляду на це метою наступного етапу дисертаційної роботи було визначити ефективність застосування антибактеріального препарату разом з імуномодулятором. Як відомо розторопша плямиста (*Silybum marianum*) володіє такими властивостями, а також є гепатопротектором [35, 65].

Таким чином, мета другого досліду полягала у з'ясуванні впливу антибактеріального препарату «Флюмек» окремо та разом з насінням розторопші плямистої (*Silybum marianum*) на інтенсивність процесів ПОЛ й активність ензимів системи антиоксидантного захисту, гематологічні показники, стан природного й адаптивного імунітету у здорових і хворих аеромонозом коропів.

Результати проведених досліджень показали, що вміст протеїну у сироватці крові хворих риб був більший, ніж у клінічно здорової риби. Відомо, що підвищення загального протеїну у крові є маркером інфекційних захворювань. Білки разом з ліпідами є основними компонентами мембран, які займають центральне положення в організації клітин органів і тканин. Вміст протеїну та співвідношення його фракцій у сироватці крові риб є видоспецифічними та залежить від сезону, віку та фізіологічного стану організму [9]. Збільшення вмісту протеїну у сироватці крові хворої риби ймовірно зумовлено комплексним впливом збудників захворювання на організм коропів, що призводить до активації метаболічних процесів у печінці, внаслідок чого стимулюється синтетична (протеїнсинтезувальна) функція гепатоцитів. При цьому необхідно зауважити, що у сироватці крові коропів, яким разом із антибактеріальним препаратом «Флюмек» задавали 5 % насіння

розторопші плямистої, зафіксовано тенденцію до зниження вмісту загального протеїну.

При дослідженні фракційного складу протеїнів сироватки крові привертає увагу зменшення в 1,5 разу ($p < 0,05$) вмісту альбумінів у хворих риб порівняно зі здоровими. При цьому у коропів другої групи, стосовно контрольної, зафіксовано зростання рівня β -глобулінів у 1,9 разу ($p < 0,05$) і γ -глобулінів – у 1,3 разу ($p < 0,05$). Результати цих досліджень свідчать, що у коропів при захворюванні на аеромоноз певною мірою зменшується білоксинтезувальна функція печінки, яку пов'язують з вмістом альбумінів [196].

Подібні зміни зафіксовані при дослідженні впливу інших антибактеріальних препаратів на протеїновий спектр плазми крові риб [11, 19, 41]. Збільшення загального вмісту глобулінів також виявлено за введення розторопші плямистої до складу кормів для риб [105, 165]

Згідно сучасних уявлень, ключове положення у патогенезі інфекційних захворювань риб займає, з одного боку, зниження їх резистентності, а з іншого – посилення вільнорадикальних процесів в їхньому організмі [206, 212]. Проведені дослідження показали, що вміст альдегідних і кетонових похідних окиснювальної модифікації протеїнів у крові коропів, хворих на аеромоноз, вірогідно більший, ніж в особин контрольної групи. Введення коропам досліджуваних препаратів спричинило зменшення вмісту продуктів окиснювального пошкодження протеїнів. Зокрема, у риб, яким задавали лише антибактеріальний препарат та у коропів, які разом із антибіотиком додатково отримували насіння розторопші плямистої, вміст ОМП₃₇₀ і ОМП₄₃₀ у крові був менший ($p < 0,05$), ніж у хворої на аеромоноз риби. Ці дані свідчать про нормалізуючий вплив досліджуваних препаратів на вміст альдегідних і кетонових похідних окиснювальної модифікації протеїнів. При цьому ці процеси були виражені більшою мірою в організмі коропів дослідної групи, які разом з препаратом «Флюмек» отримували насіння розторопші плямистої.

При дослідженні інтенсивності процесів ПОЛ в організмі риб за впливу вказаних препаратів отримано подібні результати, тільки виражені більшою мірою. Зокрема, констатовано вірогідно вищий рівень продуктів ПОЛ у плазмі крові хворих коропів щодо клінічно здорової риби. При цьому вміст гідроперекисів ліпідів і ТБК-активних продуктів у плазмі крові коропів, яким задавали лише «Флюмек» та дослідній групі, котрій застосовували антибактеріальний препарат у комплексі з насінням розторопші, був відповідно в 1,2 і 1,5 ($p < 0,001$) разу та в 1,2 ($p < 0,01$) і 1,4 разу ($p < 0,001$) менший, ніж у хворої риби. Ці дані вказують на інгібуючий вплив досліджуваних препаратів на вміст проміжних і кінцевих продуктів ПОЛ у крові риб. Подібні результати отримано авторами при дослідженні впливу інших антибактеріальних препаратів [91, 285].

Отже, результати проведених досліджень показали, що введення хворим на аеромоноз коропам досліджуваних препаратів зумовлює зниження інтенсивності процесів ПОЛ і ОМП. Ці зміни були виражені більшою мірою у крові коропів за умов застосування препарату «Флюмек» разом з насінням розторопші плямистої. Аналогічний вплив розторопші зауважують також інші автори [37, 165]. Такий ефект імовірно зумовлений комплексною адитивною дією антибіотика і розторопші плямистої. Препарат з одного боку, проявляє бактерицидні та бактеріостатичні властивості, а з іншого – активує імунні механізми захисту [89] і тим самим зменшує антигенне навантаження на організм, що сприяє зниженню вільнорадикальних процесів. Застосування розторопші, як потужного детоксикуючого чинника [35] у комплексі з антибіотиком дозволило більшою мірою нормалізувати вміст продуктів ПОЛ і ОМП, що вказує на здатність біологічно активних компонентів у її складі елімінувати активні форми кисню та знижувати інтенсивність їх накопичення. В розторопші плямистій міститься силімарин – рідкісна біологічно активна речовина, яка включає в себе чотири ізомери флавонолігнанів: силібінін, ізосилібінін, силідіанін і силікрістин [35]. Саме завдяки вмісту силімарину, розторопші властивий винятковий лікувальний ефект. Найвища концентрація

цієї речовини є в насінні [107], тому його найчастіше використовують з лікувальною метою. Силібінін також володіє широким спектром дії. Найбільш відомим механізмом його дії є антиоксидантна активність з нейтралізацією вільних радикалів й інгібування ліпідної пероксидації [65]. Крім цього, унікальність розторопші полягає ще й у тому, що вона в досить великій кількості концентрує в організмі Мідь. Як відомо Мідь входить до активного центру потужного ензиму – супероксиддисмутази, та виявляє антиоксидантні властивості. Більше того, у складі розторопші крім поліненасичених жирних кислот та біологічно активних речовини, присутні вітаміни А та Е, що також володіють антиоксидантними властивостями. У літературі наявні дані стосовно ефективності застосування розторопші плямистої для корегування інтенсивності окисних процесів у коропа за умов навантаження Свинцем [61].

Аналіз даних літератури показав, що серед механізмів регулювання вільнорадикальних та пероксидних процесів, ключова роль належить ензимам системи АОЗ, таким як супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, тощо [160]. Антиоксидантна система забезпечує адаптаційну стійкість організму в цілому та регулює реакції ПОЛ завдяки функціонуванню системи ферментативних і неферментативних механізмів контролю за вмістом активних форм кисню, вільних радикалів та продуктів пероксидації ліпідів. Її порушення призводить до розвитку в риб різноманітних патологій, обумовлених окисненням у ліпідах клітин поліненасичених жирних кислот активними формами кисню [34].

Проведені дослідження показали, що введення коропам антибактеріального препарату «Флюмек», а також за умов поєднаного його застосування разом з насінням розторопші плямистої викликало вірогідне підвищення каталазної активності у гепатопанкреасі риб порівняно з контрольною групою. Отримані нами результати узгоджуються з даними інших авторів, які вказують, що додавання розторопші плямистої до корму риbam сприяє зростанню активності антиоксидантних ензимів [35, 165].

Також нами констатовано вірогідно вищий рівень продуктів ПОЛ у гепатопанкреасі хворих коропів щодо клінічно здорової риби. Зокрема вміст дієнових конюгатів у хворих риб, яких не піддавали лікуванню, зростає у 2,6 ($p < 0,01$) разу, а вміст ТБК-активних продуктів – зростає у 2,5 разу ($p < 0,01$). Вміст ТБК-активних продуктів у гепатопанкреасі коропів, яким задавали лише антибактеріальний препарат, був у 1,6 раза менший, ніж у хворої риби, а в коропів, яким вводили антибактеріальний препарат у комплексі із насінням розторопші плямистої, вміст ТБК-активних продуктів був у 1,8 ($p < 0,05$) менший, ніж у хворих риб. При цьому виявлено тенденцію до зниження вмісту дієнових конюгатів у риб третьої і четвертої дослідних груп.

Введення розторопші, разом із антибактеріальним препаратом «Флюмек» дозволило зменшити вміст ТБК-активних продуктів та дієнових конюгатів у гепатопанкреасі коропів, уражених аеромонозом. Схожий ефект розторопші плямистої також має підтвердження у літературі [165, 235].

Загалом, отримані у цьому досліді результати досліджень свідчать, що активність імунної системи у коропів при захворюванні на асоційовану бактеріальну форму аеромонозу знижується внаслідок зменшення кількості Т-лімфоцитів (загальних і теофілінчутливих) та В-лімфоцитів. При цьому пригнічується їх функціональна активність за рахунок перерозподілу авідності рецепторного апарату імунокомпетентних клітин. Застосовані препарати спричиняли нормалізуючий вплив на кількість і функціональну активність вказаної популяції імунокомпетентних клітин, особливо за умов поєданого застосування антибактеріального препарату з меленим насінням розторопші плямистої. Така дія розторопші, очевидно пов'язана з тим, що вона накопичує важливі біологічні елементи, які сукупно з вітаміном Е, що також входить до її складу, стимулюють утворення антитіл і посилюють імунну систему організму, активізують еритропоез [107].

Також в літературі наявні дані про те, що введення насіння розторопші плямистої у кількості 5 % до раціону дволіток коропа зменшувало кількість Т-лімфоцитів (загальних, активних і теофілін-резистентних) та спричиняло

імуносупресивний вплив на їхню функціональну активність. Натомість, введення до складу комбікорму даної рослинної добавки у кількості 1 % викликало тенденцію до збільшення кількості вказаних популяцій Т-лімфоцитів крові та підвищення їхньої функціональної активності [36]. Результати цих досліджень вказують про дозозалежний вплив насіння розторопші плямистої на кількість і функціональну активність імунокомпетентних клітин.

Також за даними Тушницької Н. Й., при оральному введенні фуразолідону хворим на краснуху коропам більшу кількість Т- і В-лімфоцитів становлять їх недиференційовані форми. Водночас застосування бровасептолу збільшувало кількість ТЕ-РУЛ і Т-супресорів, натомість викликало зменшення кількості ТА-РУЛ і Th-РУЛ.

Отримані результати дослідження антимікробної чутливості польових штамів *Aeromonas hydrophila*, виділених від хворої на аеромоноз риби сімейства коропових, показали, що зберігається високий рівень чутливості аеромонад до антибіотиків фторхінолонового ряду, у тому числі до флюмеквіну, діючої речовини антибактеріального препарату «Флюмек» для застосування його у ветеринарній медицині. Рівень бактеріостатичної активності флюмеквіну коливався від 1,0 до 2,0 мкг/мл (в середньому 1,4 мкг/мл).

Дослідження лікувальної ефективності препарату «Флюмек» показало, що введення коропам, ураженим аеромонозом, антибактеріального препарату дозою 150 мг/кг комбікорму в умовах ставів має терапевтичний ефект. Зокрема, при клінічному огляді на 10-й день від початку лікування встановлено, що у риб, яким із кормом задавали «Флюмек» – виразки на поверхні тіла заросли сполучною тканиною, утворивши рубці, коропа були активними, добре споживали корм. У риб контрольної групи, яких не піддавали лікуванню, виразки на поверхні тіла залишились без змін та спостерігали значну загибель риби.

Узагальнюючи результати другого етапу досліджень необхідно зауважити, що зберігається високий рівень чутливості аеромонад до

антибіотиків фторхінолонового ряду, в тому числі до флюомеквіну, діючої речовини антибактеріального препарату «Флюомек». Пероральне введення клінічно здоровим коропам різних доз препарату «Флюомек» спричиняло зниження вмісту дієнових кон'югатів ($p < 0,05$) у гепатопанкреасі риб. При цьому виявлено вищу супероксиддисмутазну активність ($p < 0,05$) у гепатопанкреасі коропів, яким задавали досліджуваний препарат дозою 10 мг/кг маси риб. Констатовано дозозалежний вплив препарату «Флюомек» на активність природних й адаптивних механізмів захисту риб. Зокрема за введення коропам препарату «Флюомек» дозою 10 мг/кг маси риб зареєстровано вищу бактерицидну і лізоцимну ($p < 0,05$) активність сироватки крові. Водночас, за дії досліджуваного препарату дозою 20 мг/кг маси риб, разом з підвищенням фагоцитарного числа ($p < 0,05$), виявлено меншу ($p < 0,05$) кількість загальних і теофілінрезистентних Т-лімфоцитів крові.

Застосування хворим на аеромоноз коропам «Флюомеку» в комплексі з меленим насінням розторопші плямистої спричинило зменшення у крові вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів й окисної модифікації протеїнів ($p < 0,05-0,001$) та підвищення каталазної активності ($p < 0,05$), а також зафіксовано більшу ($p < 0,05-0,001$) кількість Т-лімфоцитів (загальних і теофілінчутливих). Натомість істотно не впливало на вміст загального протеїну і співвідношення його фракцій у сироватці крові.

З огляду на те, що згідно рекомендацій FAO антибіотики слід використовувати лише після ретельного розгляду варіантів профілактики та контролю захворювання [154], на третьому етапі, як альтернативу антибіотикам, застосували синбіотичний препарат «Ентеронормін», який активували водним розчином біологічно активного йоду та селену. Діючою основою «Ентеронорміну» є мультикомпонентний симбіоз пробіотичних штамів, підібраний з урахуванням синергічного доповнення унікальних властивостей кожного з них, а саме антагоністична активність відносно широкого спектру патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, синтезу

органічних кислот, вітамінів групи В, коротколанцюгових жирних кислот, різноманітного спектру ферментів.

Тому метою третього етапу було визначити вплив синбіотичного препарату «Ентеронормін», активованого водним розчином йоду і селену, на вміст продуктів ПОЛ, активність ензимів системи антиоксидантного захисту, гематологічний профіль, стан клітинних і гуморальних факторів неспецифічної резистентності, кількість Т- і В-лімфоцитів та їх функціональну активність у коропів, уражених аеромонозом.

Констатовано, що у гепатопанкреасі коропів, яким застосовували досліджуваний синбіотичний препарат, збільшується в 1,5 разу ($p < 0,05$) супероксиддисмутазна активність на тлі зниження 2,3 разу ($p < 0,05$) вмісту ТБК-активних продуктів і 3,1 разу ($p < 0,01$) кетонових похідних окиснювальної модифікації протеїнів.

Результати проведених досліджень свідчать, що у коропів, уражених аеромонозом, зафіксовано збільшення лізоцимної активності крові та вмісту циркулюючих імунних комплексів і зниження фагоцитарної активності крові. Таким чином з цих даних можна зробити припущення, що у коропів, хворих на бактеріальну форму аеромонозу, ця ланка захисту функціонально менш активна, ніж у здорових риб. Тому цей фактор може бути або одним з ведучих у патогенезі їх захворювання аеромонозом, або її наслідком.

Застосування хворим на аеромоноз коропам препарату «Ентеронормін», спричиняло нормалізуючий вплив на досліджувані показники природного захисту. Ці зміни ймовірно зумовлені комплексною адитивною дією молочнокислих бактерій (*Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* та *Bacillus subtilis spp.*) та допоміжних компонентів хітозану та пептону, що є у досліджуваному препараті. Разом з цим препарат проявляє антагоністичну активність до широкого спектру патогенних бактерій і грибів. Активація досліджуваного синбіотичного препарату водним розчином йоду і селену спричиняє підвищення антагоністичної активності мікроорганізмів, що містить препарат «Ентеронормін». Формуючи нормальну мікрофлору, препарат

«Ентеронормін» цим стабілізує захисні сили організму коропів. Окрім цього, Йод і Селен підсилюють дію один одного, мають антиоксидантні властивості захищають організм від шкідливих речовин.

Захворювання коропів асоційованою бактеріальною формою аеромонозу спричиняє імуносупресивний вплив на стан Т- і В-клітинної ланок специфічного захисту організму риб. Цей вплив характеризувався зменшенням кількості Т- і В-лімфоцитів та зниженням їх функціональної активності. А застосування хворим коропам препарату «Ентеронормін» проявляло нормалізуючий вплив на загальну кількість і функціональну активність досліджуваних імунокомпетентних клітин, і особливо Т-лімфоцитів (Е-РУЛ і А-РУЛ). Про що свідчить збільшення на поверхні Т-лімфоцитів кількості рецепторів, здатних взаємодіяти з більшою кількістю антигенних детермінант, внаслідок чого зростає активність імунної відповіді організму.

Отже, під впливом чинників препарату в імунокомпетентних клітинах коропів проходить реорганізація плазматичних мембран лімфоцитів, особливо Т-лімфоцитів, у бік зміцнення експресії рецепторів плазмолем, що вказує на розширення рецепторного поля клітини. Ці зміни ймовірно зумовлені комплексною адитивною дією компонентів синбіотичного препарату та водного розчину «Йодіс+Se», формуючи нормальну мікрофлору, проявляють позитивний вплив на місцевий секреторний імунітет.

Підсумовуючи одержані на третьому етапі досліджень дані можемо констатувати, що встановлено реабілітуючу дію синбіотичного препарату на антиоксидантний потенціал, активність факторів природного й адаптивного імунного захисту у коропів, хворих на аеромоноз. Про що свідчить відсутність вірогідних змін у досліджуваних показниках, що характеризують активність цих систем, у крові коропів дослідної групи стосовно контрольної.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проведено порівняльний аналіз інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів і протеїнів, стану антиоксидантної системи, гематологічного профілю й активності клітинної та гуморальної ланок імунітету коропів, уражених аеромонозом і асоційованою інфекцією аеромонозу та сапролегніозу. З'ясовано вплив антибактеріального препарату «Флюмек» та синбіотичного «Ентеронормін» на активність цих систем і розроблено спосіб лікування аеромонозу коропа.

1. Захворювання коропів на аеромоноз та асоційовану інфекцією аеромонозу й сапролегніозу призводить до порушення балансу в прооксидантно-антиоксидантній системі гепатоцитів. Зокрема, виявлено збільшення вмісту дієнових кон'югатів і ТБК-активних продуктів ($p < 0,05-0,01$) і зниження каталазної і супероксиддисмутазної активності ($p < 0,05-0,01$), що свідчить про підвищення інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів і зниження антиоксидантного потенціалу організму у хворих риб.

2. У крові коропів, уражених аеромонозом та асоційованою інфекцією аеромонозу й сапролегніозу, зафіксовано зниження концентрації гемоглобіну ($p < 0,05$), зменшення кількості Т-лімфоцитів (загальних і теофілін-чутливих) та В-лімфоцитів ($p < 0,05-0,001$) і зниження їх функціональної активності. Натомість виявлено підвищення бактерицидної і лізоцимної активності сироватки крові ($p < 0,05-0,001$) та збільшення вмісту циркулюючих імунних комплексів ($p < 0,05$). Вказані зміни були виражені більшою мірою у крові коропів, уражених асоційованою інфекцією аеромонозу та сапролегніозу.

3. Пероральне введення клінічно здоровим коропам різних доз препарату «Флюмек» спричиняло зниження вмісту дієнових кон'югатів ($p < 0,05$) у гепатопанкреасі риб. При цьому виявлено вищу супероксиддисмутазну активність ($p < 0,05$) у гепатопанкреасі коропів, яким задавали досліджуваний препарат дозою 10 мг/кг маси риб.

4. Констатовано дозозалежний вплив препарату «Флюмек» на активність природних й адаптивних механізмів захисту риб. Зокрема за введення коропам препарату «Флюмек» дозою 10 мг/кг маси риб зареєстровано вищу бактерицидну і лізоцимну ($p < 0,05$) активність сироватки крові. Водночас, за дії досліджуваного препарату дозою 20 мг/кг маси риб, разом з підвищенням фагоцитарного числа ($p < 0,05$), виявлено меншу ($p < 0,05$) кількість загальних і теофілінрезистентних Т-лімфоцитів крові.

5. Пероральне введення хворим на аеромоноз коропам препарату «Флюмек» окремо, а також за умов поєднаного його застосуванням разом з насінням розторопші плямистої, спричинило зменшення у крові вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів й окисної модифікації протеїнів ($p < 0,05-0,001$) та підвищення каталазної активності ($p < 0,05$). Натомість істотно не впливало на вміст загального протеїну і співвідношення його фракцій у сироватці крові.

6. У крові коропів за введення антибактеріального препарату з меленим насінням розторопші плямистої виявлено більшу ($p < 0,05-0,001$) кількість Т-лімфоцитів (загальних і теофілінчутливих), при цьому число В-лімфоцитів та їх функціональна активність була на рівні особин контрольної групи.

7. Дослідження антимікробної чутливості польових штамів *Aeromonas hydrophila*, виділених від хворої на аеромоноз риби сімейства коропових, показали, що зберігається високий рівень чутливості аеромонад до антибіотиків фторхінолонового ряду, в тому числі до флюмеквіну, діючої речовини антибактеріального препарату «Флюмек».

8. У гепатопанкреасі коропів, яким застосовували синбіотичний препарат «Ентеронормін», виявлено в 1,5 разу ($p < 0,05$) вищу супероксиддисмутазну активність на тлі зниження 2,3 разу ($p < 0,05$) рівня ТБК-активних продуктів і зменшення вмісту у крові в 3,1 разу ($p < 0,01$) кетонових похідних окиснювальної модифікації протеїнів.

9. Встановлено реабілітуючу дію синбіотичного препарату «Ентеронормін», активованого водним розчином йоду і селену, на активність факторів природного й адаптивного імунного захисту у коропів, хворих на аеромоноз. Про що свідчить відсутність вірогідних змін у досліджуваних показниках, що характеризують активність цих систем, у крові дослідної групи стосовно контрольної.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Для лікування риби, хворої на аеромоноз, рекомендовано застосовувати антибактеріальний препарат «Флюмек» із розрахунку 150 мг/кг комбікорму у комплексі з 5 % меленим насінням розторопші плямистої. Препарати розчиняють у воді і заливають у комбікорм або кормосуміш до повного поглинання розчину. Лікувальний корм готують у день згодовування риби та застосовують упродовж 10-ти днів з одноденною перервою між п'ятиденками.

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Алимов С. И. Рыбное хозяйство Украины: стан і перспективи. К.: Вища освіта. 2003. 336 с.
2. Апатенко В. М. Ветеринарна імунологія та імунопатологія Київ : Урожай, 1994. 128 с.
3. А01К 61/00 Россия Способ оздоровления карпою в рыболовны х хозяйствах на сбросных каналах электростанций заражениях ассоциативными возбудителями аэромоноза и сапролегниоза / Лысенко А.А., Куклева Я.В., Христич В.А. (Россия). RU: 2309586 С; заявл. 30.03.2006; опубл. 10.11.2007
4. АС № 1084681 СССР, МКИ G № 33/48. Способ определения гидроперекисей липидов в биологических тканях / Мирончик В. В. (СССР). № 3468369/28-13; заявл. 08.07.82; опубл. 07.04.84, Бюл. № 13.
5. Баглай, О. М., Мурська, С. Д., Гутий, Б. В., Гуфрій, Д. Ф. Система антиоксидантного захисту та перекисне окиснення ліпідів організму тварин. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 2011. Т. 13, № 4(2). С. 3-11
6. Басанкина В.М., Басанкина А.В. Аэромоноз рыб: эпизоотологические особенности, клинические признаки, патологоанатомические изменения. *Ветеринария Кубани*. 2019. № 2. С.21-23.
7. Бех В. В., Ірназаров І. Оцінка імунної відповіді різних ліній коропа, *Cyprinus carpio* L., після штучного інфікування бактерією *Aeromonas hydrophila*. *Рибогосподарська наука України*. 2008. №2.С. 49-56.
8. Бисенова Г. Н., Текебаева Ж. Б., Уразова М. С., Абитаева Г. К., и другие. Изучение эффективности пробиотика на модели бактериальной болезни мальков в лабораторных условиях. *Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство*. 2019. № 2. С. 14-21 <http://doi.org/10.24143/2073-5529-2019-2-14-21>
9. Біяк В. Я, Синюк Ю. В., Курант В. З. Видові особливості фракційного складу білків сироватки крові прісноводних риб. *Доп. Нац. акад. наук України, Тернопіль. нац. пед ун-т ім. В. Гнатюка*. 2008. № 4. С. 189–192.

10. Божик, О. В. Клітинний імунітет райдужної форелі при диплостомоз риб. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Гжицького*. 2010. Т. 12. № 4(2). С. 3-11.

11. Васильева С.В., Магомедов Р.Р. Состояние белкового обмена у молоди палии при аэромонозе. *Развитие и актуальные вопросы современной науки*. 2017. №7. С. 162-164.

12. Ващенко А. В. Результати вирощування різновікових груп канального сома (*Ictalurus punctatus Rafinesque*) з використанням пробіотичних кормових добавок NUPRO® та BIO-MOS®. *Рибогосподарська наука України*. 2015. №4. С. 78-89.

13. Видишев, Ю. А. Диагностика аэромоноза лососёвых рыб Магаданской области. *Международный вестник ветеринари*. 2011. №3. С. 46-48.

14. Віщур О. І. Природна резистентність деяких видів риб / О. І. Віщур, І. В. Кичун, Н. М. Лешовська, Н. А. Мамчук, В. Й. Ямроз, І. Й. Матлах, І. М. Рокита // *Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та Держ. н.-д. контрол. ін-ту ветпрепаратів та корм. добавок*. 2008. Вип. 9, № 3. С. 343-347.

15. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 257 с.

16. Влізло В. В. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / В. В. Влізло зі співавт. Львів : Сполом, 2012. 355–369.

17. Вовк Н. И. Перспективные экологически безопасные методы профилактики болезней рыб, направленные на повышение иммунного статуса их организма. *Матер. межд. научн.-практ. конф. "Пробл. разв. рыбн. хоз.-ва на внутр. водоемах в условиях перехода к рын. отнош."* Минск: "Хата". 1998. С. 283–287.

18. Гаврилин К. В., Воробьев Н. А. Эффективность Антибака 100 при аэромонозе карпов. *Ветеринария*. 2013. № 3. С. 15-16.

19. Гарайда В.М., Пірус Р.І. Вплив Фенарону на фізіолого-біохімічні

показники крові коропа. *Рибогосподарська наука України*, 2008. № 1, С.56-59.

20. Грициняк І. І. Обмін ліпідів у риб : моногр. / І. І. Грициняк, К. Б. Смолянінов, В. Г. Янович ; за ред. В. В. Влізла. Львів : «Тріада плюс», 2010. 335 с.

21. Грубинко В. В. Леус Ю.В. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита у рыб (обзор). *Гидробиологический журнал*. 2001. Т. 37, № 1. С. 64-78.

22. Гунчак В. М., Стецько Т.І. Особливості антибіотикотерапії у сучасній ветеринарній медицині. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Гжицького*. 2012. Том 14, № 2 (52). С. 74-84.

23. Дегтярик С. М., Слободницкая Г. В., Гребнева Е. И., Бенецкая Н. А., Максимьюк Е. В., Беспалый А. В. Влияние фитонцидов растений на жизнеспособность и вирулентность этиологических агентов бактериальных инфекций у рыб. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук*. 2017. № 1. С. 79-89.

24. Дерень О. В. Вплив ехінацеї пурпурової на деякі гематологічні та біохімічні показники крові однорічок коропа. *Рибогосподарська наука України*. 2009. № 4. С. 130-133.

25. Дорофейчук В. Г. Лизоцимная активность сыворотки крови. *Лабораторное дело* 1986. № 1. С. 28–34.

26. Драган Л. П. Особливості процесів пероксидного окиснення ліпідів у печінці райдужної форелі в динаміці вірусної інфекції. *Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок*. 2014. Т. 15. № 2-3. С. 132-136.

27. Дубініна О.Ю. Окислювальний стрес і окислювальна модифікація білків. *Медична хімія*. 2001. Т. 3, №2. С. 5-12.

28. Дубинина Е. Е., Сальникова Л. Я., Ефимова Л. Я. Активность и изоферментный спектр СОД эритроцитов. *Лабораторное дело* 1983. № 10. С.

30–33.

29. Євтушенко А. В., Безкровна Н. В., Герілович А. П., Солодянкін О. С. Діагностика аеромонозу риб за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. *Ветеринарна медицина*. 2012. Вип. 96. С. 104-107.

30. Єгоров Б. В., Макаринська А. В. Сучасні альтернативи кормовим антибіотикам. *Зернові продукти і комбікорми*. 2010. №3. С. 27-34.

31. Иванова Н. Т. Атлас клеток крови рыб : сравнительная морфология и классификация формен. элементов крови рыб : Легкая и пищевая промышленность. 1983. 77 с.

32. Іхтіопатологія : підручник / Н. І. Вовк, В. Й. Божик. К. Агроосвіта. 2014. 308 С.

33. Катерова Е. А. Комплекс лечебно-профилактических мероприятий с использованием нового препарата Антибак-500 при ликвидации краснухи карпа в рыбоводческих хозяйствах Краснодарского края. *Труды ВИЭВ, том 80 часть 2. Представлены материалы юбилейной Международной научно-практической конференции, посвященной 120-летию со дня создания ВИЭВ «Здоровье животных: современные научные подходы, направления, тенденции»*. Вип. 22. 2018 <http://doi.org/10.30917/ATT-PRINT-2018-4>

34. Кожевников Ю. Н. О перекисном окислении липидов в норме и патологии : обзор. *Вопросы медицинской химии*. 1985. № 1. С. 2-7.

35. Кориляк М. З. Фітотерапевтичні властивості розторопші плямистої та її використання в годівлі тварин. *Рибогосподарська наука України*. 2013. № 4. С. 97-108.

36. Кориляк М. З., Віщур О. І., Грициняк І. І. Вплив розторопші плямистої (*Silybum marianum*) на стан Т-і В-клітинного імунітету та природну резистентність дволіток коропа. *Рибогосподарська наука України*. 2019. №3. С. 89-100. <https://doi.org/10.15407/fsu2019.03.089>

37. Кориляк М. З., Грициняк І. І., Дерень О. В., Добрянська, О. П. Перебіг окисних процесів в гепатопанкреасі дволіток коропа за введення до складу кормів насіння розторопші плямистої (*Silybum*

marianum). *Рибогосподарська наука України*. 2017. №1. С. 73-83.
<https://doi.org/10.15407/fsu2017.01.073>

38. Коробейникова Є. Н. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой *Лабораторное дело* 1989. № 7. С. 8–9.

39. Коцюмбас І. Я., Гунчак В. М., Стецько Т. І. Проблеми використання антимікробних препаратів для стимулювання росту продуктивних тварин та альтернативи їх застосуванню. *Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок*. 2013. Вип. 14. № 3-4. С. 381-389.

40. Кравців Ю. Р., Маслянюк Р. П. Т-лімфоцити і їх регуляторні функції. *Науковий вісник ЛНАВМ ім. С. З. Гжицького*. 2007. Т. 9, № 1(32). С. 308–318.

41. Курбатова І.М. Білки плазми крові коропа за дії сульфаніламідів. *Біологія тварин*, 2017. т.19, №2, с. 50-55
<http://doi.org/10.15407/animbiol19.02.050>

42. Леус Ю. В Грубинко В. В.,. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита у рыб. *Гидробиологический журнал* 2001. Т. 37, № 1. С. 64–78.

43. Лысенко А.А. Ассоциативные заболевания прудовых рыб при интенсивном рыборазведении. *Ветеринария*. 2003. С. 32 – 34.

44. Лысенко А.А., Куклева Я.В. Ассоциативные заболевания рыбы при разведении в прудовых хозяйствах Краснодарского края. *Труды КубГАУ "Новые методы профилактики и лечения болезней животных"*. 2004. № 406 (434). С. 57-61.

45. Лысенко А.А., Яровая Л.Д. Ассоциативные болезни прудовых рыб в рыбоводных хозяйствах Краснодарского края. *Сборник трудов международной конференции и 3-го съезда паразитологического общества при РАН*. Санкт-Петербург. 2003. с. 5-8.

46. Лобойко Ю.В., Данко М.М. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ферментів у тканинах однорічок коропа

за змішаної інвазії ектопаразитами. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Гжицького*. 2015. Т. 17, № 1 (1). с. 90-95.

47. Лук'яненко В. Й. Імунологія риб. Вроджений імунітет. Москва. 1983. 269 с.

48. Луцзяк В.І., Багнюкова Т.В., Лужна Л.І. Показники оксидативного стресу. Пероксиди ліпідів. *Український біохімічний журнал*. 2006. Т. 78. №5.С. 113–119.

49. Мазур Т. В., Гаркуша І. Є. Біохімічний та клітинний склад крові коропа звичайного за впливу експериментального пробіотика на основі *Bacillus Subtilis* та *Lactobacillus Acidophilus*. *Науковий вісник НУБіП. Серія «Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва»*. 2015. №221. С. 238-243.

50. Матвієнко Н., Солопова Х., Шепелевич В. Асоційована бактеріальна інфекція коропових риб. *Міжнародна наукова конференція «Досягнення та перспективи розвитку мікробіології»: Програма та збірник тез доповідей*. Сполом. Львів, 2016. С. 52–53.

51. Методичні рекомендації для оцінки та контролю імунного статусу тварин: визначення факторів неспецифічної резистентності, клітинних і гуморальних механізмів імунітету проти інфекційних захворювань / Р. П. Маслянюк, І. І. Олексюк, А. І. Падовський та співавт. Львів. 2001. 87 с.

52. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев *Лабораторное дело* 1988. № 1. С. 16–18.

53. Мешишен І. Ф., Польовий В. П. Механізм окиснювальної модифікації білків. *Бук. мед. Вісник*. 1999. Т. 3(1). С. 196-205.

54. Микряков В. Р., Балабанова Л. В. Физиологические реакции иммуноцитов рыб *Вопросы эволюционной физиологии : тез. докл.* Л.: Наука, 1984. С. 204–205.

55. Микряков В. Р. Закономерности формирования приобретенного

иммунитета у рыб. Рыбинская типография. 1991. 154 С.

56. Микряков В. Р. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.; Наука 2001. 126 с.

57. Морозова М. А., Абросимова К.С. Аэромонады прудовых хозяйств юга России и их влияние на обмен веществ карпа. *Рыбоводство и рыбное хозяйство*. 2020. № 2 (169) С. 54-59.

58. Наумова А.М., Наумова А.Ю., Логинов Л.С. Эпизоотологический мониторинг рыбоводных хозяйств и рыбопромысловых водоёмов России. *Труды ВНИРО*, 2016. Том 162. С. 97-103.

59. Нечаев А.П., Кочеткова А.А. Пищевые и биологически активные добавки, ароматизаторы и технологические вспомогательные средства. *Учебное пособие*. СПб: ГИОРД, 2007. С. 201-214.

60. Олексик Н.П., Янович В.Г. Активність антиоксидантних ферментів у тканинах ставкових риб різних видів. *Наук.- техн. бюл. Ін-ту біол. тварин*. 2006. Вип. 7, №1, 2. С. 83-85.

61. Опалинский Ю. А., Віщур О. І. Ефективність застосування розторопші плямистої (*Silybum marianum*) для коректування інтенсивності окисних процесів у коропа за умов навантаження свинцем. *Рибогосподарська наука України*, 2016. № 3. С. 99-110. <https://doi.org/10.15407/fsu2016.03.099>

62. Особливості хімічного складу розторопші плямистої / М. Д. Колесник, С. О. Семенов, І. Б. Баньковська [та ін.] // Вісник Полтавської державної академії. 2007. № 1. С. 93-95.

63. Особа І. А. Біологічна роль перекисного окиснення ліпідів у забезпеченні функціонування організму риб. *Рибогосподарська наука України*. 2013. № 1. С. 87– 96.

64. Особа І. А. Особливості функціонування системи антиоксидантного захисту організму. *Рибогосподарська наука України*. 2009. № 1. С. 133-139.

65. Особливості хімічного складу розторопші плямистої / Колесник М. Д. та ін. *Вісник Полтавської державної академії*. 2007. № 1. С. 93—95.

66. Паламарчук Р. А., Дерень О. В. Визначення ефективності використання амаранту (*Amaranthus*) в годівлі коропа за різних умов вирощування. *Рибогосподарська наука України*. 2018. №2. С. 103-115.

67. Петров Р. В. Изучение действия комплекса препаратов «Бифитрил» и «Рибосан» для лечения карпов при аэромоноз. *Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал*. Витебск, 2016. Т. 52, вып. 2. С. 63-66.

68. Петров Р. В. Применение препаратов «Кемзайм» и «Бровасептол концентратм» для лечения карпов при аэромонозе [Электронный ресурс] / Р. В. Петров // Доклады Таджикской академии сельскохозяйственных наук. – Душанбе : Таджикская академия сельскохозяйственных наук, 2015. - № 3 (45). - С. 58–61. <https://www.taas.tj/images/doclad/doclad8.2015.3.pdf>

69. Попова Е. М., Коцій І.В. Ліпіди як компонент адаптації риб до екологічного стресу. *Рибогосподарська наука України*. 2007. № 1. С. 49-56.

70. Романова Е. М., Любомирова, В. Н., Шадыева, Л. А., Шленкина, Т. М. Пробиотики и адаптогены в лечении аэромоноза африканского клариевого сома. *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. 2017. №4 (40). С. 86-93.

71. Руденко О. П., Віщур О. І., Коваленко В. Л. Видові та сезонні особливості неспецифічної резистентності коропових риб. *Ветеринарна біотехнологія*. Київ, 2016. Вип. 28. С. 241–246.

72. Силкина Н.И., Микряков В.Р., Микряков Д.В. Морфофункциональное состояние иммунокомпетентных органов карпа *Cyprinus Carpio L.* при заражение аэромонозом. *Рыбоводство и рыбное хозяйство*. 2008. № 1. С. 57-59.

73. Сільвестров В. В. Методические указания по определению уровня естественной резистентности и оценке иммунного статуса рыб. 1999. № 13-4-2. 1795 с.

74. Скогорева А.М., Манжурина О.А., Ромашов Б. В. Диагностика

заразных болезней рыб: учебное пособие. Воронеж:ФГБОУ ВО ВГАУ, 2016. – 108 с.

75. **Солопова Х.Я.** Антибактеріальна дія препарату «Флюмек» щодо збудника аеромонозу коропів. *Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини : матеріали XVI Всеукр. наук.-практ. конф. (м. Львів, 8–9 груд. 2017 р.).* Львів, 2017. С. 149.

76. **Солопова Х.Я.** Вплив препарату «Флюмек» на показники неспецифічної резистентності коропа. *Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини : матеріали XV Всеукр. наук.-практ. конф. (м. Львів, 8–9 груд. 2016 р.).* Львів, 2016. С. 188.

77. **Солопова Х. Я.** Природні механізми захисту коропових риб за ураження бактерійним аеромонозом і за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін». *Біологія тварин.* Львів, 2020, т. 22, №1. С. 46-49.
<http://doi.org/10.15407/animbiol22.01.046>

78. **Солопова Х.Я.** Стан Т- І В-клітинної ланок імунітету коропів за ураження аеромонозом та асоційованою інфекцією аеромонозу з сапролегніозом. «Молоді вчені у розв'язанні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини»: матеріали XIX Всеукр. наук.-практ. інтернет-конф., (м. Львів, 3-4 груд. 2020 р.). Львів, 2020. С. 104.

79. **Солопова Х. Я., Віщур О.І.** Гематологічні та мікробіологічні показники, стан природних механізмів захисту у коропа за дії препарату "Флюмек". *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки.* Львів, 2016. Т. 18, № 3(71). С. 100–104.

80. **Солопова Х.Я., Віщур О.І.** Вплив препарату «Флюмек» і його комплексу з насінням розторопші плямистої на вміст загального білка та співвідношення окремих його фракцій у коропів, уражених аеромонозом. *Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини : матеріали XVII Всеукр. наук.-практ. конф. (м. Львів, 6–7 груд. 2018 р.).* Львів, 2018. С. 137.

81. **Солопова Х.Я.,** Віщур О.І. Рівень окиснювального пошкодження білків та інтенсивність процесів ПОЛ в організмі коропів, уражених аеромонозом, та за лікування препаратом «Флюмек». *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія «Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва»*. Київ, 2018. Вип. 285. С. 351–359.

82. **Солопова Х.Я.,** Віщур О.І. Стан Т- і В-клітинної ланок імунітету коропів, уражених аеромонозом, та за лікування препаратом Ентеронормін. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. Біла Церква, 2020. № 1. С.40–46.
<http://doi.org/10.33245/2310-4902-2020-154-1-40-46>

83. **Солопова Х.Я.,** Віщур О.І., Кориляк М.З., Соловодзінська І.Є. Стан системи антиоксидантного захисту у гепатопанкреасі коропів за асоційованої інфекції аеромонозу з сапролегніозом. *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування*. 2020. № 6. С. 85-89.
<https://doi.org/10.31890/vttp.2020.06.15>

84. **Солопова Х.Я.,** Віщур О.І., Морміль Л.В. Стан гуморальної ланки природної резистентності організму коропів за умов ураження аеромонозом і сапролегніозом. *Збірник матеріалів XVI Міжнародної науково-практичної конференції професорсько-викладацького складу, аспірантів і студентів «Актуальні проблеми ветеринарної медицини»*. Київ, 2017. С.108.

85. **Солопова Х.Я.,** Віщур О.І., Соловодзінська І.Є. Вплив препарату «Флюмек» і його комплексу з насінням розторопші на систему антиоксидантного захисту у коропів, уражених аеромонозом. *Збірник матеріалів II Міжнародної науково-практичної конференції "Сучасні проблеми раціонального використання водних біоресурсів" (м. Київ, 27-29 жовтня 2020 р.)*. Київ, 2020. С. 109-111.

86. **Солопова Х.Я.,** Віщур О.І., Стецько Т.І., Угрин Г.П., Хом'як О.І.. Антимікробна активність нового хіміотерапевтичного препарату на основі флюмеквіну щодо *Aeromonas Hydrophila*. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.*

3. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки. Львів, 2017. Т. 19, № 82. С. 66–70.

87. Солопова Х., Кориляк М., Добрянська О. Вплив препарату «Ентеронормін» на систему антиоксидантного захисту у коропів, уражених аеромонозом. *«Молоді вчені у розв'язанні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини»:* матеріали XVIII Всеукр. наук.-практ. конф., м. (5-6 груд. 2019 р.). Львів, 2019. С. 151.

88. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. С.63.

89. Тимочко М.Ф., Кобилінська Л.І. Вільнорадикальні реакції та їх метаболічна роль. *Медична хімія*. 1999. Т. 1. № 1. С. 19-25.

90. Тітова Т.В., Петров Р.В. Використання пробіотику «Біфітріл» для профілактики аеромонозу у коропів в експериментальних умовах. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія : Ветеринарна медицина. 2017. Вип. 11. С. 134-136.

91. Тушницька Н.Й. Янович В.Г., Матвієнко Н.М. Антиоксидантний статус коропа при захворюванні асоційованою формою краснухи. *Наук.-техн. бюл. Інст. біол. твар. та ДНДКІ ветпреп. і корм. доб.* 2006. Вип. 7. № 1, 2. С. 182–186.

92. Тушницька Н. Й., Матвієнко Н. М., Янович В. Г. Імунний статус коропа при захворюванні асоційованою формою краснухи. *Біологія тварин*. 2006. Вип. 8. № 1, 2. С. 251-254.

93. Федорович О. В. Білковий склад сироватки крові білого амура і товстолобика, інвазованих дактилогірусами і гіродактилюсами. *Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин*. 2015. Т. 16. № 1. С. 125-130.

94. Фотіна Г. А. Визначення середньосмертельних доз антибактеріального препарату Бровасептол концентрат для лабораторних тварин. *Ветеринарна медицина*. 2014. Т. 99. С. 174-177.

95. Фотіна Т. І., Петров Р. В. Якісна оцінка риби та рибопродуктів при аеромонозі коропів та товстолобиків. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Гжицького*. 2011. Т. 13, № 4(4). С. 349-351.

96. Хоулт Дж. Определитель бактерий Берджи в 2-х т. том 1. Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит. М.: Мир, 1997. 432 с.

97. Якобисяк М. Імунологія. Вінниця: Нова книга, 2004. 672с.

98. Янович Н. Є., Янович Д. О. Роль мікроелементів у життєдіяльності ставкових риб. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького*. 2014. Т.16, № 2(59). С. 345 -372

99. Abid A., Davies S. J., Waines P., Emery M., Castex M., Gioacchini G., Merrifield D. L. Dietary synbiotic application modulates Atlantic salmon (*Salmo salar*) intestinal microbial communities and intestinal immunity. *Fish & shellfish immunology*. 2013. V.35(6). p.1948-1956. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.039>

100. Abarike E. D., Kuebutornye F. K., Jian J., Tang J., Lu Y., Cai J. Influences of immunostimulants on phagocytes in cultured fish: a mini review. *Reviews in Aquaculture*. 2019. Vol. 11(4). p. 1219-1227. <https://doi.org/10.1111/raq.12288>

101. Abdel-Latif H. M., Dawood M. A., Menanteau-Ledouble S., El-Matbouli M. The nature and consequences of co-infections in tilapia: A review. *Journal of Fish Diseases*. 2020. Volume 43, Issue 6. p. 651-664. <https://doi.org/10.1111/jfd.13164>

102. Addo S., Carrias A. A., Williams M. A., Liles M. R., Terhune J. S., Davis D. A. Effects of *Bacillus subtilis* strains on growth, immune parameters, and *Streptococcus iniae* susceptibility in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 2017. Vol. 48(2). P. 257-267. <https://doi.org/10.1111/are.13300>

103. Adeshina I. The effect of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary supplement on nonspecific immune response and disease resistance in juvenile common carp, *Cyprinos carpio*. *International Food Research Journal*. 2018. Vol. 25(6). P. 2345-2351.

104. Ahmad I, Pacheco M., Santos M. A. Enzymatic and non-enzymatic antioxidants as an adaptation to phago-cyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following insitu harbour water exposure. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 2004. Vol. 57. 290-320 pp. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00080-0](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00080-0)

105. Ahmadi K., Banaee M., Vosoghei A. R., Mirvaghefi A. R., Ataeimehr B. Evaluation of the immunomodulatory effects of silymarin extract (*Silybum marianum*) on some immune parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Actinopterygii: Salmoniformes: Salmonidae). *Acta Ichthyologica Et Piscatoria*. 2012. Volume 42(2). P. 113-120. <https://doi.org/10.3750/AIP2011.42.2.04>

106. Ai Q., Xu H., Mai K., Xu W., Wang J. et al. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Aquaculture*. 2011. Volume 317, Issues 1–4. 2011. p. 155-161. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.036>

107. Alishahi M., Soltani M., Mesbah M., Rad A. E. Effects of dietary *Silybum marianum* extract on immune parameters of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Veterinary Research*. 2011. Volume 66. No.3. pp. 255-286.

108. Alvarez-Pellitero P. Fish immunity and parasite infections: From innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2008. Vol. 126, No. 3, P. 171–198. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.07.013>

109. Ardó L., Yin G., Xu P., Váradi L., Szigeti G., Jeney Z., Jeney G. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*. 2008. Vol. 275, 26–33.

110. Austin B. Methods for the diagnosis of bacterial fish diseases. *Marine Life Science & Technology*. 2019. P. 1-9. <https://doi.org/10.1007/s42995-019-00002-5>

111. Avsever M. L., Polat S. H., Türk N., Metin D. Y. *Saprolegnia* sp. and *Aeromonas hydrophila* isolation from freshwater-crayfish (*Astacus*

leptodactylus). *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2011. Volume 17, No. 5. P. 873-875.

112. Bakaletz L. O. Developing animal models for polymicrobial diseases. *Nature Reviews Microbiolog.* 2004. Volume 2(7). p. 552-568.

113. Baldissera M. D., de Freitas Souza C., Dias J. B., Da Silva A. S., Baldisserotto B. Caffeine supplementation in diet mitigates *Aeromonas hydrophila*-induced impairment of the gill phosphotransfer network in grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Microbial pathogenesis*. 2019. Volume 136, p. 103710 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103710>

114. Baldissera M. D., Souza, C. F., Abbad L. B., da Rocha M. I. U., da Veiga M. L., da Silva, A. S., Baldisserotto B. Oxidative stress in liver of grass carp *Ctenopharyngodon idella* naturally infected with *Saprolegnia parasitica* and its influence on disease pathogenesis. *Comparative Clinical Pathology*. 2020. Vol. 29. P. 581–586. <https://doi.org/10.1111/are.14567>

115. Baldissera M. D., Souza C. F., Abbad L. B., Verdi C. M., Santos R. C., da Silva A. S., Baldisserotto B. Dietary supplementation with caffeine increases survival rate, reduces microbial load and protects the liver against *Aeromonas hydrophila*-induced hepatic damage in the grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Microbial pathogenesis*. 2019, volume 135, 103637. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103637>

116. Banaee M., Sureda A., Mirvaghefi A. R., Rafei G. R. Effects of long-term silymarin oral supplementation on the blood biochemical profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish physiology and biochemistry*. 2011. Vol. 37 (4). P. 885-896. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9486-z>

117. Bello O. S., Olaifa F. E., Emikpe B. O. Haematological and blood biochemical changes in African catfish, *Clarias gariepinus* fed walnut (*Tetracarpidium donophorum* Mull. Arg.) leaf and onion (*Allium cepa* Linn) bulb supplemented diets. *American Journal of Experimental Agriculture*. 2014. Vol. 4, No. 12. P. 1593–1603. <https://doi.org/10.9734/ajea/2014/6622>

118. Bernard D., Six A., Rigottier-Gois L., Messiaen S., Chilmonczyk S., Quillet E., Benmansour A. Phenotypic and functional similarity of gut intraepithelial and systemic T cells in a teleost fish. *The Journal of Immunology*. 2006. Vol. 176 (7). P. 3942-3949. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.7.3942>
119. Biller J. D., Takahashi L. S. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2018. Vol. 90 (4). P. 3403-3414. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170730>
120. Blood parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) kept in heated water culture at different feeding regimes. Serpunin G. G. et al. *Acta scientiarum Polonorum*. 2002. Vol. 1(2). P. 121—128.
121. Boyum F. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. Journal. Clin. Lab. Invest.* 1968. Vol. 21., No 97. P. 77–79.
122. Bowden T.J. Modulation of the immune system of fish by their environment . *Fish & Shellfish Immunol.* 2008. Vol. 25. P. 373 – 83. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.017>
123. Briede I. The actual fish diseases in Latvia. *Acta Biol. Univ. Daugavp*, 2010, Vol.10 (2). P. 137-142.
124. Bulone V., Rzeszutek E., Díaz-Moreno S. M. Identification and characterization of the chitin synthase genes from the fish pathogen *Saprolegnia parasitica*. *Frontiers in microbiology*. 2019. Volume 10. P. 2873. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02873>
125. Cabello F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*. 2006. Volume 8. p. 1137-1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054>.
126. Carinede F. S., Descovi S.N., Antoniazzi A, Cargnelutti J.F., Bernardo Baldisserotto B. *Aeromonas hydrophila* infection in silver catfish causes hyperlocomotion related to stress. *Microbial pathogenesis*. 2019. Volume 132. P. 261-265 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.05.017>

127. Carlson E., Zelikoff J. T. The immune system of fish : a target organ of toxicity. *The Toxicology of Fishes*. 2008. P. 489– 530.

128. Gatesoupe F.J. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2008. V. 14(1-3). P. 107-114. <http://doi.org/10.1159/000106089>.

129. Cerezuela R., Meseguer J., Esteban M. A. Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture: a review. *Journal of Aquaculture Research & Development S*. 2011. Vol 1. p. 1-7. <http://doi.org/10.4172/2155-9546.S1-008>

130. Chandrarathna H. P. S. U., Nikapitiya C., Dananjaya S. H. S., Wijerathne C. U. B., Wimalasena S. H. M. P., Kwun H. J., De Zoysa M. Outcome of co-infection with opportunistic and multidrug resistant *Aeromonas hydrophila* and *A. veronii* in zebrafish: Identification, characterization, pathogenicity and immune responses. *Fish & shellfish immunology*. 2018. Vol.80. p. 573-581. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.049>

131. Chang P. H., Wu T. P., Chung H. Y., Chien C. Y. *Aeromonas hydrophila* and *Saprolegnia australis* isolated from Ayu, *Plecoglossus altivelis* with ulcerative skin disease in Taiwan. *Bulletin-European association of fish pathologists*. 202. Vol. 22(6), p. 393-399.

132. Chen J., Liu N., Zhang H., Zhao Y., Cao X. The effects of *Aeromonas hydrophila* infection on oxidative stress, nonspecific immunity, autophagy, and apoptosis in the common carp. *Developmental & Comparative Immunology*. 2020. Vol. 105. P. 103587. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103587>

133. Ghiasi F., Mirzargar S. S., Badakhshan H., Shamsi, S. Lysozyme in Serum, Leukocyte Count and Phagocytic Index in *Cyprinus carpio* under the Wintering Conditions. *Journal of fisheries and Aquatic Science*. 2010. Vol. 5 (2). P. 113-119.

134. Chilmonczyk S. The thymus in fish: development and possible functions in the immune response. *Ann. Rev. Fish Dis*. 1992. Vol. 2. P. 181-200. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90063-4](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90063-4)

135. Citarasu T., Alfred D.K., Velmurugan S., Thanga V.V., Kumaran T., Michael B.M., Selvaraj T. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from infected ornamental fish hatchery during massive disease outbreak. *International Journal of Current Research*. 2011. Volume 2, Issue 12. p. 37-41.

136. Claudiano G. S., Yunis-Aguinaga J., Marinho-Neto F. A., Miranda R. L., Martins I. M., Otani F. S., de Moraes F. R. Hematological and immune changes in *Piaractus mesopotamicus* in the sepsis induced by *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*. 2019. Volume 88. P. 259-265. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.044>

137. Commission regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*. p. 15/1-15/72. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf

138. Crumlish M., Thanh P. C., Koesling J., Tung V. T., Gravningen K. Experimental challenge studies in Vietnamese catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage), exposed to *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of fish diseases*. 2010. Volume 33. Issue 9. p. 717-722. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01173.x>

139. Das A., Sahoo P. K., Mohanty B. R., Jena J. K. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in *Puntius sarana*: early changes in blood and aspects of the innate immune-related gene expression in survivors. *Veterinary immunology and immunopathology*. Volume 142, Issues 3–4. 2011. P. 207-218. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.05.017>

140. Das S, Ward L. R, Burke C. Prospects of using marine Actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008. Vol. 81(3). p. 419-429 <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1731-8>

141. Dawood M. A., Eweedah N. M., Moustafa E. M., Shahin M. G. Synbiotic effects of *Aspergillus oryzae* and β -glucan on growth and oxidative and immune responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Probiotics and*

antimicrobial proteins. 2020. Vol. 12 (1). P. 172-183.
<https://doi.org/10.1007/s12602-018-9513-9>

142. Defoirdt T., Boon N., Sorgeloos P., Verstraete W., Bossier P. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in biotechnology*. 2007. Volume 25, Issue 10. P. 472-479. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.08.001>

143. Defoirdt T., Sorgeloos P., Bossier P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current opinion in microbiology*. 2011. Volume 14, Issue 3. p. 251-258. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.004>

144. Detection of antimicrobial peptides related to piscidin 4 in important aquacultured fish / J. Corrales et al. *Developmental & Comparative Immunology*. 2010. No. 34. P. 331–43. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.11.004>

145. Dey R.K., Chandra S. Preliminary studies to raise disease resistant seed (fry) of Indian major carp *Catla catla* (Ham.) through herbal treatment of spawn. *Fish Chimes*. 1995. Vol. 14. P. 23–25.

146. Dinctürk E., Tanrikul T. T., Culha S. T. Fungal and Bacterial Co-Infection of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) in a Recirculating Aquaculture System: *Saprolegnia parasitica* and *Aeromonas hydrophila*. *Aquatic Sciences and Engineering*. 2018. V. 33(3). p. 67-71.
<https://doi.org/10.26650/ASE201811>

147. Dong H. T., Nguyen V. V., Phiwsaiya K., Gangnonngiw W., Withyachumnarnkul B., Rodkhum C., Senapin S. Concurrent infections of *Flavobacterium columnare* and *Edwardsiella ictaluri* in striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* in Thailand. *Aquaculture*. 2015. Volume 448. p. 142-150. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.046>

148. Düğenci S.K., Arda N. & Candan A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003. Vol. 88. P. 99–106.

149. Ellis A.E. Immunology of fishes. Ontogeny of the immune system . In *Handbook of Vertebrate Immunology*. 1998. p. 26 – 30.

150. Ellis A.E. Immunity to bacteria in fish . *Fish Shellfish Immunol.* 1999. Vol. 9. P. 291-308. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0192>
151. Ellis A. E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology.* 2001. Vol. 25(8-9). P. 827-839. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00038-6)
152. Escobar J. A., Rubio M.A., Lissi E.A. SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. *Free Radical Biol. Med.* 1996. Vol. 20, № 3. P. 285-290.
153. Fagbenro O. A., Adeparusi E. O., Jimoh W. A. Haematological profile of blood of African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822) fed sunflower and sesame meal based diets. *Journal of Fisheries and Aquatic Science.* 2013. Vol. 8. P. 80–86.
154. FAO. In: Serrano PH, ed. Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture. Rome: FAO; 2005:98. *FAO Fisheries Technical Paper* .469pp.
155. FAO *The State of World Fisheries and Aquaculture.* 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. Italy. 200 pp.
156. Fernandes D. C., Eto S. F., Funniceilli M. I., Fernandes C. C., Charlie-Silva I., Belo A., Pizauro J. M. Immunoglobulin Y in the diagnosis of *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture.* 2019. Vol. 500. P. 576-585. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.045>
157. Francis C. H., Ellis A. E. *Fish Shellfish Immunol.* 1994. V. 4. P. 489-497.
158. Fridovich I. Superoxide radical and Superoxide dismutase. *Ann. Rev. Biochem.* 1995. Vol. 64. P. 97-112.
159. Geng X., Dong X.H., Tan B.P., Yang Q.H., Chi S.Y., et al. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish and Shellfish Immunology.* 2011. Volume 31(3). P. 400-406. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.06.006>
160. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity,

cause, or consequence. *Lancet*. 1994. 344(8924). P. 721—724.

161. Haematological responses of *Tilapia guineensis* to acute stress. Akinrotimi O. A. et al. *International J National and Applied Sci*. 2009. No. 5. P. 338–343.

162. Hansen J. D., Zapata A. G. Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunol Rev*. 1998. Vol. 166, P. 199–220.

163. Harikrishnan R., Rani M. N., Balasundaram C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture*. 2003. Volume 221. Issues 1–4. P. 41-50. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00023-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00023-1)

164. Harris J., Bird D. J. Modulation of the fish immune system by hormones. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2000. Vol. 77(3-4). P. 163-176. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(00\)00235-X](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(00)00235-X)

165. Hassaan M.S., Mohammady E.Y., Soaudy M.R., El-Garh H.A., Moustafa M.M., Mohamed S.A., El-Haroun E.R. Effect of *Silybum marianum* seeds as a feed additive on growth performance, serum biochemical indices, antioxidant status, and gene expression of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquaculture*. 2019. Volume 509, p. 178-187. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.006>

166. Hjerde E., Karlsen C., Sorum H., Parkhill J., Willassen N. P., Thomson N. R. Co-cultivation and transcriptome sequencing of two co-existing fish pathogens *Moritella viscosa* and *Aliivibrio wodanis*. *BMC genomics*. 2015. Volume 16(1), p. 447. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1669-z>

167. Hochachkka P. W. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes: Metabolic Biochemistry*. Elsevier Publishing Company.

168. Hoseinifar, S. H., Yousefi S., Van Doan H., Ashouri G., Gioacchini G., Maradonna F., Carnevali O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Fish: The Implications of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotics. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*. 2020. P. 1-20. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1795616>

169. Hua Tao Li, Si Yi Tang, Wen Hao Du. et al. The Effects of Ethoxyquin

and Angelica Sinensis Extracts on Lipid Oxidation in Fish Feeds and Growth, Digestive and Absorptive Capacities and Antioxidant Status in Juvenile Red Carp (*Cyprinus Carpio* Var. *Xingguonensis*): A Comparative Study. *Fish Physiol Biochem.* 2019. Volume 45(1). P. 43-61. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0533-x>

170. Hussien A. M., Ahmed I. E., Waled S. E., Omima A. A trial for Induction of Saprolegniosis in *Mugel cephalus* with Special Reference to Biological Control. *Journal of American Science.* 2010. Volume 6(6). p. 203-209.

171. Hwang J.H., Lee S.W., Rha S.J., Yoon H.S., Park E.S., Han K.H. Kim S.J. Dietary green tea extract improves growth performance, body composition, and stress recovery in the juvenile black rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture International.* 2013. Volume 21. P. 525–538.

172. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues / V. I. Lushchak, T. V. Bagnyukova, V. V. Husak. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005. Vol. 37, № 8. P. 1670-1680. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.02.024>

173. Ibrahim M.D., Fathi M., Mesalhy S., Abd El-Aty A.M. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology.* 2010. Volume 29(2). p. 241-246. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.03.004>

174. Irianto A, Austin B. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases.* 2002. Volume 25, Issue 11. p. 633-642. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00422.x>

175. Isuev A. R. Peroxidation of lipids and antioxidant activity in the fingerlings of Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* as an index of oil contamination in a water environment / A. R. Isuev, M. M. Gabibov, S. A. Guseinova. *J. Ichthyol.* 2000. V. 40. P. 471–478.

176. Iwama G., Nakanishi T. The fish immune system: organism, pathogen, and environment. Academic Press. 1997. 380 P.

177. Jeeva S., Lekshmi N. P., Brindha J. R., Vasudevan A. Studies on

antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* Isolated from gold fish (*Carassius auratus*). *International Journal of Current Microbiology and applied Science*. 2013, Vol. 2(12). P. 7-13.

178. Jian J., Wu Z. Influences of traditional Chinese medicine on non-specific immunity of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *Jian*). *Fish and Shellfish Immunology*. 2004. 16, 185–191.

179. Jondal M., Holm G., Wiqzell H. Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells *J. Exp. Med.* 1972. Vol. 136. No. 2. P. 207–21.

180. Joshi P K, Bose M. and Harish D. Changes in certain haematological parameters in a siluroid catfish *Clarias batrachus* (Linn) exposed to cadmium chloride. *Pollution Resources*. 2002. No. 21 (2). P. 129–131.

181. Junior G. B., de Freitas Souza C., Descovi S. N., Antoniazzi A., Cargnelutti J. F., Baldisserotto B. *Aeromonas hydrophila* infection in silver catfish causes hyperlocomotion related to stress. *Microbial pathogenesis*. 2019. Volume 132, P. 261-265. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.05.017>

182. Karapetkova M., Jivkov M. *Fishes in Bulgaria*. Gea-Libris, Sofia. 2006.

183. Karlsen C., Vanberg C., Mikkelsen H., Sørum H. Co-infection of Atlantic salmon (*Salmo salar*), by *Moritella viscosa* and *Aliivibrio wodanis*, development of disease and host colonization. *Veterinary microbiology*. 2014. Volume 171, Issues 1-2. p. 112-121. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.011>

184. Karunasagar I., Karunasagar I., Otta S. K. Disease problems affecting fish in tropical environments. *Journal of Applied Aquaculture*. 2003. Vol. 13(3-4), p. 231-249. https://doi.org/10.1300/J028v13n03_03

185. Kazun B., Małaczewska J., Kazun K., Żylińska-Urban J., Siwicki A. K. Immune-enhancing activity of potential probiotic strains of *Lactobacillus plantarum* in the common carp (*Cyprinus carpio*) fingerling. *Journal of veterinary research*. 2018. Volume 62 (4). P. 485-492. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0062>

186. Keene J.L., Noakes D.L.G., Moccia R.D., Soto C.G. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).

Aquaculture Research. 1998. V. 29(2). P. 89-101.

187. Kim H. J., Oseko N., Nishizawa T., Yoshimizu M. Protection of rainbow trout from infectious hematopoietic necrosis (IHN) by injection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) or Poly (I: C). *Diseases of aquatic organisms*. 2009. Volume 83. No.2. p. 105-113. <https://doi.org/10.3354/dao02000>

188. Kiron V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology*. 2012. Vol. 173, P. 111–133. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.015>

189. Klemme I., Louhi K. R., Karvonen A. Host infection history modifies co-infection success of multiple parasite genotypes. *Journal of Animal Ecology*. 2016. Volume 85(2). p. 591-597. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12472>

190. Koppang E. O., Fischer U., Moore L., Tranulis M. A., Dijkstra J. M., Köllner B., Hordvik I. Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *Journal of anatomy*. 2010. Volume 217 (6). P. 728-739. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01305.x>

191. Koshak Z., Degtyaric S. Reserch on the impact of phytobiotic containing compound feed on the resistance of carp to bacterial infections. *Grain Products and Mixed Fodder's*. 2019. Volume 19 (3). P. 13-18. <https://doi.org/10.15673/gpmf.v19i3.1507>

192. Kordon A. O., Karsi A., Pinchuk L. Innate immune responses in fish: antigen presenting cells and professional phagocytes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2018. Volume 18(9). P. 1123-1139. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v18_9_11

193. Kotob M. H., Gorgoglione B., Kumar G., Abdelzaher M., Saleh M., El-Matbouli M. The impact of *Tetracapsuloides bryosalmonae* and *Myxobolus cerebralis* co-infections on pathology in rainbow trout. *Parasites & vectors*. 2017. Volume 10(1). P. 442. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2347-6>

194. Kotob M.H., Menanteau-Ledouble S., Kumar G. et al. The impact of co-infections on fish: a review. *Vet Res*. 2017. P. 47-98. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0383-4>

195. Kum C., Sekkin S. The immune system drugs in fish: Immune function, immunoassay, drugs, recent advances in fish farms. Faruk Aral (Ed.). 2011. Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-fish-farms/the-immune-system-drugs-in-fish-immune-function-immunoassay-drugs>.

196. Kurbatova I. M. The protein spectrum of blood plasma carp for the actions of chlortetracycline. *Hydrobiological Journal*. 2016. Vol. 52, no. 2, pp. 103–108

197. Kusdarwati R., Kurniawan H., Prayogi Y. T. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* and *Saprolegnia* sp. on catfish (*Clarias gariepinus*) in floating cages in Bozem Moro Krembangan Surabaya. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2017. Vol. 55, No. 1, p. 12-38. IOP Publishing.

198. Laing K. J., Hansen J. D. Fish T cells: recent advances through genomics. *Developmental & Comparative Immunology*. 2011. Volume 35(12). P. 1282-1295. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.004>

199. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 1990. V. 186. P. 465–478.

200. Liu Q., Chen Q., Kong B., Han J., He X. The influence of superchilling and cryoprotectants on protein oxidation and structural changes in the myofibrillar proteins of common carp (*Cyprinus carpio*) surimi. *LWT-Food Science and Technology*. 2014. Volume 57(2). P. 603-611. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.023>

201. Liu X., Sun W., Zhang Y., Zhou Y., Xu J., Gao X., Zhang X. Impact of *Aeromonas hydrophila* and infectious spleen and kidney necrosis virus infections on susceptibility and host immune response in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*). *Fish & Shellfish Immunology*. 2020. Volume 105. P. 117-125. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.07.012>

202. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951. V. 193 (1). P. 265–275.

203. Lobova T. I., Yemelyanova E., Andreeva I. S., Puchkova L. I., Repin V. Y. Antimicrobial resistance and plasmid profile of bacterial strains isolated from the urbanized Eltsovka-1 River (Russia). *Microbial Drug Resistance*. 2015. Volume 21(4). P. 477-490. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0203>
204. Lone S. A., Manohar S. Saprolegnia parasitica, a lethal oomycete pathogen: demands to be controlled. *Journal of Infection and Molecular Biology*. 2018. Volume 6, Issue 2. p. 36-44. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.jimb/2018/6.2.36.44>
205. Lukač M., Cizelj I., Jelić D., Mutschmann F. Diagnosis, treatment and clinical signs of Saprolegnia sp. infection in olms (Proteus anguinus). In *Proceedings of the International Conference on Diseases of Zoo and Wild Animals*. 2015. p. 162-164.
206. Lushchak V. I., Lushchak L. P., Mota A. A. and Hermes-Lima M. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol.* 2001. No. 280. P. 100–107.
207. Magnadottir B. Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology*. 2010. Volume 12 (4). p. 361-379.
208. Magnadottir B. Innate immunity of fish (overview) *Fish Shellfish Immunol.* 2006. Vol. 20. P. 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>
209. Magnadottir B. , Lange S. , Gudmundsdottir S., Dalmo R.A. Ontogeny of humoral immune parameters in fish . *Fish & Shellfish Immunol.* 2005. Volume 19. P. 429 – 39. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.010>
210. Maiming M.J., Nakanishi T. The specific immune response: cellular defenses In *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. *Fish Physiology*. 1999. Vol 15. p. 159 – 205.
211. Mark G. Papich. VET01S. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, 3rd Edition / Mark G. Papich al. 2015 *Clinical and Laboratory Standards Institute*. P.50-112.
212. Martinez-Alvarez R. M., Morales A. E., Sanz A. Antioxidant defenses

in fish: biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fish.* 2005. V. 15. № 1. P. 75–88.

213. Martins M. L., Vieira F. N., Jerônimo G. T., Mourino J. L., Dotta G., Speck G. M., Pereira G. Leukocyte response and phagocytic activity in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Fish physiology and biochemistry*. 2009. Volume 35(219). <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9262-x>

214. Mehrabi Z., Firouzbakhsh F., Jafarpour A. Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2011. Volume 96(3). P. 474-481. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01167.x>

215. Mishra S, Mohanty S, Pattnaik P., Ayyappan S. Probiotics: possible application in aquaculture. *Fish Chimes*. 2001. V. 21. p. 31-37.

216. Modesto K. A., Martinez C. B. Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 2010. Volume 81(6). P. 781-787.

217. Morselli M. B., Baldissera M. D., Souza C. F. Effects of thymol supplementation on performance, mortality and branchial energetic metabolism in grass carp experimentally infected by *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis*. 2020. Volume 13(1). P. 103915. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103915>

218. Moseley P. Stress proteins and the immune response . *Immunopharmacology*. 20200. Volume 48. P. 299-302. [https://doi.org/10.1016/S0162-3109\(00\)00227-7](https://doi.org/10.1016/S0162-3109(00)00227-7)

219. Munday P.L., Wilson S.K. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *Journal of Fish Biology*. 1997. V. 51(5). P. 931-938.

220. Muñoz-Atienza E., Gómez-Sala B., Araújo C., Campanero C., Del Campo R., Hernández P. E., Cintas L. M. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended

for use as probiotics in aquaculture. *BMC microbiology*. 2013. Volume 13(15).
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-15>

221. Nagasawa T. Phagocytosis by thrombocytes is a conserved innate immune mechanism in lower vertebrates. *Frontiers in Immunology* 2014. No. 5. P. 445. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00445>

222. Nakanishi T., Toda H., Shibasaki Y., Somamoto T. Cytotoxic T cells in teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*. 2011. Volume 35 (12). P. 1317-1323. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.033>

223. Nakanishi T., Shibasaki Y., Matsuura Y. (2015). T cells in fish. *Biology*. 2015. Volume 4 (4). P. 640-663. <https://doi.org/10.3390/biology4040640>

224. Nakao M., Tsujikura M., Ichiki S., Vo T. K., Somamoto T. The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches. *Developmental & Comparative Immunology*. 2011. Volume 35(12). P. 1296-1308. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.003>

225. Nayak S.K. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*. 2010. Vol. 29(1). P. 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>

226. Nayak S. K., Nakanishi T. Direct antibacterial activity of CD8+/CD4+ T-cells in gimbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Fish & shellfish immunology*. 2013. Volume 34(1). P. 136-141. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.016>

227. Neiffer D., Stamper M. Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*. 2009. V. 50. No. 4. P. 343-360. <https://doi.org/10.1093/ilar.50.4.343>

228. Noga E. J. Fish disease: diagnosis and treatment. John Wiley & Sons, 2010. P. 519.

229. Official Journal of the European Union L276/33, 2010. Directive 2010/63/EU of The European Parliament and of The Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. 86/609/EC. 20.10.2010

230. Oliva-Teles A. Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of fish diseases*. Vol. 35(2). p. 83-108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x>.

231. Oystein L., Oystein E., Sorensen A. et al. Study on lysozyme activity in some fish species. *Diseases of aquatic organisms*. 1989, vol. 6, pp. 1–5.

232. Pandiyan P., Balaraman D., Thirunavukkarasu R., George E.G.J., Subaramaniyan K., Manikkam S., Sadayappan B. Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today*. 2013. Volume 5(1). P. 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.dit.2013.03.003>

233. Pérez Sánchez T., Ruiz Zarzuela I., de Blas I., Balcázar J. L. Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Reviews in Aquaculture*. 2014. Volume 6 (3). p. 133–146. <https://doi.org/10.1111/raq.12033>

234. Pombout J. H. Teleost intestinal immunology. *Fish Shellfish Immunol*. 2010. Vol. 31. P. 616–26. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.001>

235. Pradhan S. C., Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian Journal of Medical Research*. 2006. Vol. 124, № 5. P. 491-504.

236. Press C. M., Evensen O. The morphology of the immune system in teleost fish. *Fish Shellfish Immunol*. 1999. Vol. 9. P. 309–318.

237. Pronina G. I. On the possibilities of enhancing the immune stability of aquatic organisms in aquaculture. *News of OGAU*. 2014. Vol. 3. P. 180–183.

238. Rauta P. R., Nayak B., Da S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunology Letters*. 2012. Vol. 148, No. 1, P. 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.08.003>

239. Researches on the activity of oxidoreductases from tissues harvested in different stages of development at *Cyprinus carpio* / Arteni O. M. et al. Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară. 2010. T. 11. P. 83–86.

240. Ringo E., Van Doan H., Lee S. H., Soltani M., Hoseinifar S. H., Harikrishnan R., Song S. K. Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*. 2020. Volume

129. Issue 1. P. 116-136. <https://doi.org/10.1111/jam.14628>

241. Rodrigues M. V., Dias M. F. F., Francisco C. J., David G. S., da Silva R. J., Junior J. P. A. *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Brazilian aquaculture: a public health problem. *Emergent Life Sciences Research*. 2019. V. 5. P. 48-55. <https://doi.org/10.31783/elsr.2019.514855>

242. Rombout J.H, Abelli L, Picchietti S., Scapigliati G., Kiron V. Teleost intestinal immunology. *Fish Shellfish Immunol*. 2010. No.31 p. 616-626. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.001>

243. Rombout J. H. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol*. 2005. No. 19(5). P. 441–55. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.007>

244. Ronald J. Roberts. Fish pathology. John Wiley & Sons, 2012. <https://doi.org/10.1002/9781118222942>

245. Rubio-Godog M. Teleost fish immunology: Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2010. Vol. 1 (1). P. 47–57.

246. Rudneva I. I. Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. Volume 118 (2). P. 255-260. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(97\)00111-4](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(97)00111-4)

247. Sahu M.K., Swarnakumar N.S., Sivakumar K., Thangaradjou T., Kannan L. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian J Microbiol*. 2008. Volume 48. p. 299-308. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0024-3>

248. Salighehzadeh R., Sharifiyazdi H., Akhlaghi M., Khalafian M., Gholamhosseini A., Soltanian S. Molecular and clinical evidence of *Aeromonas hydrophila* and *Fusarium solani* co-infection in narrow-clawed crayfish *Astacus leptodactylus*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2019. Volume 132(2). P. 135-141. <https://doi.org/10.3354/dao03309>

249. Salinas I., Zhang Y. A., Sunyer J. O. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011. No. 35(12), P. 1346– 1365. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.11.009>

250. Saraiva M., Adamek M., Noguera P., Ciulli S., Palíková M., Aguirre-Gil I., Haenen O. Co-infections and multiple stressors in fish. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 2020. Volume 40(1). P. 4-19

251. Saurabh S., Sahoo P. Lysozyme: an important defense molecule of fish innate immune system. *Aquaculture research.* 2008. Vol. 39, № 3. P. 223-239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x>

252. Sebastiao F. A., Lemos E. M., Pilarski F. Development of an absolute quantitative Real-Time PCR (qPCR) for the diagnosis of *Aeromonas hydrophila* infections in fish. *Acta Scientific Microbiology.* 2018. №1. P. 23-29. <https://doi.org/10.31080/ASMI.2018.01.0034>

253. Secombes C. J. Cytokines and innate immunity of fish. *Comp. Immunol.* 2001. Vol. 25 P. 713–723.

254. Sergaliyev N. H., Absatirov G. G., Tumenov A. N., Sariyev B. T., Ginayatov N. S. Nosological Description of Fish Pathologies in RAS. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 2017. Volume 9, Iss. 9. P. 1637-1641.

255. Sewaka M., Trullas C., Chotiko A., Rodkhum C., Chansue N., Boonanuntanasarn S. Efficacy of synbiotic Jerusalem artichoke and *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented diets on growth performance, serum biochemical parameters, intestinal morphology, immune parameters and protection against *Aeromonas veronii* in juvenile red tilapia (*Oreochromis* spp.). *Fish & shellfish immunology.* 2019. Volume 86. P. 260-268. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.026>

256. Sharifuzzaman S. M., Austin B. Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology.* 2009. Volume 27, Issue 3. p. 440-445. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.06.010>

257. Sharma A., Deo A. D., Riteshkumar S. T., Chanu T. I., Das A. Effect of *Withania somnifera* (L. Dunal) root as a feed additive on immunological parameters and disease resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Fish & Shellfish Immunology.* 2010. Volume 29. Issue 3. 2010. P. 508-512. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.05.005>

258. Somamoto T., Koppang E. O., Fischer U. Antiviral functions of CD8+ cytotoxic T cells in teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*/ 2014. Volume 43(2). P.197-204. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.07.014>

259. Song S. B., Xu Y., Zhou, B. S. Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (Cyprinus carpio). *Chemosphere*. 2006. Volume 65(4). P. 699-706. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.033>

260. Srivastava V., Rezinciuc S., Bulone V. Quantitative proteomic analysis of four developmental stages of *Saprolegnia parasitica*. *Frontiers in microbiology*. 2018. Volume 8. P.2658. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02658>

261. Stenger S., Hanson D. A., Teitelbaum R., Dewan P., Niazi, K. R., Froelich C. J. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*. 1998. Volume 282(5386). P. 121-125. <https://doi.org/10.1126/science.282.5386.121>

262. Storey K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Bras. J. Med. Biol. Res.* 1996. № 29. p. 1715–1733.

263. Study on lysozyme activity in some fish species. L. Oystein, E. Oystein, A. Sorensen et al. *Diseases of aquatic organisms*. 1989. V. 6, P. 1-5.

264. Tartor H. M., Matsuura nY., El-Nobi G., Nakanishi T. Lack of a contact requirement for direct antibacterial activity of lymphocyte subpopulations in gimbuna crucian carp. *Fish & shellfish immunology*. 2014. Volume 39(2). P. 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.006>

265. T-cell subsets and T cell-mediated immunity / F. Broere et al. *In Principles of immunopharmacology*. 2011. P. 15–26. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10811-3_3

266. T cell diversity and TcR repertoires in teleost fish / R. Castro et al. *Fish Shellfish Immunol*, 2011. Vol. 31. P. 644–54. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.08.016>

267. Toda H., Saito Y., Koike T., Takizawa F., Araki K. Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes in a teleost

fish. *Developmental & Comparative Immunology*. 2011. Volume 35(6). P. 650-660.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.01.013>

268. Toda H., Shibasaki Y., Koike T., Ohtani M., Takizawa F., Ototake M. Alloantigen-specific killing is mediated by CD8-positive T cells in fish. *Developmental & Comparative Immunology*. 2009. Volume 33(4). P. 646-652.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.11.008>

269. Tort L., Balasch J. C., Mackenzie S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*. 2003. Volume 22(3). P. 277-286.

270. Trede N. S., Langenau D. M., Traver D., Look A. T., Zon L. I. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity*, 2004. Volume 20(4). P. 367-379.
[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00084-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00084-6)

271. Van Muiswinkel Willem B, Brenda Vervoorn-Van Der Wal B. The immune system of fish. In: *CAB International*. 2006. Vol. 1.

272. Vershuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000. Volume 64(4). p. 655-671.
<https://doi.org/10.1128/membr.64.4.655-671.2000>

273. Vhu P., Aul W. E. Peripheral CD4⁺ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev*, 2010. No. 238, P. 247– 62. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00951.x>

274. Vinodhini R., Narayanan M. Biochemical changes of antioxidant enzymes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) after heavy metal exposure. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2009. Vol. 33(4). P. 273-278.
<https://doi.org/10.3906/vet-0711-18>

275. Wahli T., Burr S.E., Pugovkin D. , Mueller O., Frey J. *Aeromonas sobria* , a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fl uviatilis* L . *J. Fish Dis*. 2005. Vol. 28. P. 141–150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00608.x>

276. Wang W., Sun J., Liu C., Xue Z. Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. *Aquaculture Research*. 2017. Vol. 48(1). P. 1-23. <https://doi.org/10.1111/are.13161>

277. WHO monographs on selected medicinal plants // Fructus Silybi Mariae. Vol. 2. Geneva : World Health Organization, 2002. P. 300—316.

278. Wiik-Nielsen J., Alarcón M., Jensen B. B., Haugland Ø., Mikalsen A. B. Viral co-infections in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., displaying myocarditis. *Journal of fish diseases*. 2016. Volume 39, Issue 12. P. 1495-1507. <https://doi.org/10.1111/jfd.12487>

279. Wilhelm Filho, D. Fish antioxidant defenses a comparative approach. *Brazilian journal of medical and biological research. Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. Vol. 29(12). P.1735-1742.

280. Winston G. W. Oxidant and antioxidant in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol*. 1991. Vol. 100, № 1–2. P. 173–176.

281. Yan-BoWang, Jian-Rong Li, Junda Lin. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture*. Volume 281, Issues 1–4, 2008. P. 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.002>

282. Yasumoto S., Yoshimura T., Miyazaki T. Oral immunisation of common carp with a liposome vaccine containing *Aeromonas hydrophila* antigen . *Fish Pathology*. 2006. Vol. 41. P. 45-49 . <https://doi.org/10.3147/jsfp.41.45>

283. Yider J. A. Investigating the morphology, function and genetics of cytotoxic cells in bony fish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2004. Vol. 138., No. 3. P. 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.03.008>

284. Yoder J., Litman G. W. The phylogenetic origins of natural killer receptors and recognition: relationships, possibilities, and realities, *Immunogenetics*. 2011. Vol. 63, P. 123–41.

285. Yuan L., Li M., Meng F., Gong Y., Qian Y., Shi G., Wang R. Growth, blood health, antioxidant status, immune response and resistance to *Aeromonas hydrophila* of juvenile yellow catfish exposed to di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology &*

- Pharmacology*. Volume 202. 2017. P. 79-84.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.08.004>
286. Zapata A. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish and Shellfish Immunology* 2006. Vol. 20. P. 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.005>
287. Zapata A.G.; Chiba A., Varas A. Cells and tissues of the immune system of fish. In *Fish Physiology*. 1997. Volume 15, p. 1–62.
288. Zhang D.X., Kang Y.H., Zhan S., Zhao Z.L., Jin S.N., Chen C., Zhang L., Shen J.Y. Effect of *Bacillus velezensis* on *Aeromonas veronii*-Induced Intestinal Mucosal Barrier Function Damage and Inflammation in Crucian Carp (*Carassius auratus*). *Frontiers in Microbiology*. 2019. Volume 10. P. 2663.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02663>.
289. Zhang L., Li Q., Hong H., Luo Y. Prevention of protein oxidation and enhancement of gel properties of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi by addition of protein hydrolysates derived from surimi processing by-products. *Food Chemistry*. 2020. Volume 316. P. 126343.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126343>
290. Zhang L., Wang C. C. Inflammatory response of macrophages in infection. *Hepatobiliary Pancreat Dis. Int.* 2014. No. 13. P. 138–152.
291. Zheng Y., Zhou F., Zhang L., Wang H., Wang X. C. Effect of different extent of protein oxidation on the frozen storage stability of muscle protein in obscure pufferfish (Takifugu obscurus). *LWT*, 2020. P. 110416.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110416>
292. Zhu J., Paul W. E. Heterogeneity and plasticity of T helper cells, *Cell Res*, 2010 Vol. 20. P. 4–12. [https://doi.org/10.1016/S1499-3872\(14\)60024-2](https://doi.org/10.1016/S1499-3872(14)60024-2)
293. Zimmerman L. M., Vogel L. A. Phagocytic B cells in a reptile. *Biol. Lett.* 2010 Vol. 6. P. 270–273. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0692>
294. Zou J, Bird S, Secombes C. J. Antiviral sensing in teleost fish. *Current Pharmaceutical Design*. 2010. Vol 16. P. 4185–93.
<https://doi.org/10.2174/138161210794519093>

ДОДАТКИ

Додаток А



(11) 144100

(19) UA

(51) МПК

A01K 61/13 (2017.01)

A23K 20/10 (2016.01)

A23K 50/80 (2016.01)

- (21) Номер заявки: u 2019 07735
- (22) Дата подання заявки: 09.07.2019
- (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.09.2020
- (46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: 10.09.2020, Бюл. № 17

(72) Винахідники:

Віщур Олег Іванович, UA,
Пірус Роман Іванович, UA,
Солопова Христина
Ярославівна, UA

(73) Власник:

ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ,
вул. В. Стуса, 38, м. Львів-34,
79034, UA

(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ ЛІКУВАННЯ АЕРОМОНОЗУ КОРОПА

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб лікування аеромонозу коропа, що включає згодовування комбікорму або кормосуміші з бактерицидним препаратом, який відрізняється тим, що як бактерицидний препарат використовують препарат "Флюомек" із розрахунку 150 мг на 1 кг комбікорму, який розчиняють у воді і заливають в комбікорм або кормосуміш до повного поглинання розчину, причому лікувальний корм готують в день згодовування риби та згодовують протягом 10-ти днів з однією перервою між п'ятиденками.

Додаток Б (1)



**Тимчасова настанова
щодо застосування препарату «Флюмек»
в рибництві**

Опис:

Порошок білого кольору.

Склад:

1 г препарату містить 500 мг діючої речовини флюмеквіну, допоміжна речовина – натрію карбонат.

Фармакологічні властивості:

Флюмеквін володіє широким спектром протимікробної дії. Препарат особливо ефективний по відношенню до бактерій, резистентних до інших груп антибіотиків і сульфаніламідів. Володіє низькою токсичністю, не володіє тератогенними властивостями.

Протипоказання:

Не застосовувати з іншими протимікробними засобами. Не застосовувати одночасно з триметопримом, сульфаніламидами, фуросином, фенілбутазоном і гідрокортизоном.

Механізм дії:

Препарат діє бактерицидно, порушуючи синтез ДНК в бактеріальних клітинах, блокуючи життєво важливий фермент бактерій — ДНК-гіразу. «Флюмек» діє на мікроорганізми не тільки в період росту та має не лише антибактеріальну дію, а й постантибіотичний ефект та імуномодуючу дію.

Застосування:

Для лікування гострої форми аеромонозу у коропових риб.

Дозування

Перед внесенням препарат «Флюмек» розводять з кормом, або готують попередньо гранульований корм, із розрахунку 150 мг антибактеріального препарату на 1 кг корму рибам. Застосовувати 10 днів.

Форма випуску:

Пакети з поліетиленової плівки, або іншої полімерної плівки по 1, 2, 5, 10, 50, 100, 500 г та 1, 20, 25 кг.

Зберігання:

Суше, темне приміщення при температурі від 15⁰ до 25⁰С, в місцях недоступних для дітей і тварин, окремо від харчових продуктів. Термін зберігання 36 місяців.

Настанова розроблена Львівською дослідною станцією Інституту рибного господарства НААН. Розглянуто та схвалено Вченою радою ІРГ.

Протокол № 8 від 18 грудня 2018 року.

Додаток Б (2)



**Тимчасова настанова
щодо застосування препарату «Ентеронормін»
в рибництві**

Опис:

Порошок для перорального застосування від сіро-жовтого до сіро-коричневого кольору.

Склад:

Enterococcus spp 1-5x10⁹ КУО/г, *Bacillus subtilis* spp 1-5x10⁹ КУО/г, *Lactobacillus* spp 1-5x10⁷ КУО/г; хітозан водорозчинний; пептон ферментативний; цукор мелений;

Фармакологічні властивості:

Ентеронормін володіє широкою антагоністичною активністю до патогенних бактерій. Препарат не має кумулятивної здатності. Несумісний з окремими антибіотиками, до яких чутливі штами-продуценти.

Протипоказання:

Відсутні.

Механізм дії:

Препарат проявляє антагоністичну активність до широкого спектру патогенних бактерій і грибів. Формуючи нормальну мікрофлору, тим самим нормалізує секреторний імунітет, обмін речовин, стабілізує захисні сили організму, збільшує продуктивність та збереженість, зменшує витрати кормів на одиносторонню приросту живої ваги.

Застосування:

Для профілактики та як допоміжний засіб при лікуванні бактеріальних інфекцій у коропових риб.

Дозування:

Перед використанням, для активування мікроорганізмів, необхідну кількість препарату розчиняють у питній воді у пропорції від 1 до 3 до 1 до 5 і настоюють 16 год при кімнатній температурі. Препарат задають перорально (розводять з кормом) від 3 до 10 днів щомісяця.

Форма випуску:

Поліетиленові флакони по 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 40,0; 200 г, або пакети з полімерів по 0,5; 1; 5; 30 кг.

Зберігання:

Суше, темне приміщення за температури від -20°C до +25°C. Термін придатності два роки. Термін придатності після першого відкриття упаковки (відбору): один місяць.

ДОДАТОК В (1)

«Погоджено»
 Директор Львівської дослідної станції
 Інституту рибного господарства НААН
 Ковальчук О.М.
 «6» липня 2018р.

«Затверджено»
 Директор Львівської дослідної
 станції Інституту рибного господарства НААН
 Черник Ю.П.
 «6» липня 2018р.

АКТ

про здійснення виробничої перевірки науково-дослідної роботи з вивчення ефективності
 застосування антибактеріального препарату «Флюмекс» в умовах ставів на організм
 уражених аеромонозом дволіток коропа

від 6 липня 2018 року

Ми, що нижче підписалися, комісія в складі завідувача лабораторії іхтіопатології Львівської дослідної станції ІРГ НААН Піруса Р.І., молодшого наукового співробітника лабораторії іхтіопатології Морміль Л.В., молодшого наукового співробітника лабораторії селекції Куць У.С., аспірантки Інституту біології тварин НААН Солопової Х.Я., склали даний акт про те що, з метою виконання виробничої перевірки наукової роботи досліджено ефективність застосування препарату «Флюмекс» при лікуванні хворих на аеромоноз дволіток коропів в умовах ставів. Для цього ставки № 18 та № 19, загальною площею 0,36 га кожен, були зарибнені коропами ураженими аеромонозом. У дослідному ставку № 18 хворим риbam задавали препарат «Флюмекс» із розрахунку 150 мг на 1 кг комбікорму, який розчиняли у воді і заливали в кормосуміш до повного поглинання розчину, причому лікувальний корм готували в день згодовування риби та згодовували протягом 10-ти днів з одноденною перервою між п'ятиденками. Риbam у ставку № 19 задавали корм без препарату (контроль). Через 10 днів після годівлі проведено контрольний облов ставків. При клінічному огляді встановлено, що риби, яким із кормом задавали «Флюмекс» – клінічно здорові. Виразки на поверхні тіла заросли сполучною тканиною утворивши рубці. У риб контрольної групи (став № 19) виразки на поверхні тіла залишилися без змін, та спостерігали відхід риби.

Пірус Р.І.
 Морміль Л.В.
 Куць У.С.
 Солопова Х.Я.

Додаток В (2)

«Погоджено»
Директор Львівської дослідної станції
Інституту рибного господарства НААН
Ковальчук О.М.
« 15 » липня 2019р.

«Погоджено»
Директор Львівської дослідної
станції Інституту рибного господарства НААН
Черник Ю.П.
« 16 » липня 2019р.

А К Т про виробничу перевірку

1. **Найменування науково-дослідної установи-розробника** Львівська дослідна станція Інституту рибного господарства
(НДІ, дослідна станція, відділ, лабораторія та ін.)
2. **Найменування завершених робіт, поставлених на виробничу основу** «Спосіб лікування аеромонозу коропа».
3. **Автори завершених робіт** Пірус Р.І., в.о. зав. лабораторії іхтіопатології Львівської дослідної станції ІРГ НААН, Морміль Л.В., м.н.с., Солопова Х.Я., аспірантка.
(П. І. П., посада, звання)
4. **Завершені науково-дослідні роботи рекомендовані до виробничої перевірки** «Дослідити ефективність застосування антибактеріального препарату «Флюмек» у комплексі з 5% меленим насінням розторопші плямистої при лікуванні аеромонозу коропа в умовах ставів».
(НДІ, дослідні станції та ін.)
5. **Виробнича перевірка проводилась у** Державному підприємстві дослідному господарстві Львівської дослідної станції Інституту рибного господарства НААН
(найменування господарства, підприємства, його відомче підпорядкування)
Городоцького району, Львівської області
(місцезнаходження: республіка, край, область)
6. **Відповідальні за проведення виробничої перевірки** Морміль Л.В., Солопова Х.Я., аспірантка
(П. І. П., установа, господарство, посада)
7. **Умови проведення перевірки** Годівля та утримання риб здійснювались з дотриманням рибоводних норм
(господарсько-економічні, що відповідають встановленим вимогам)
8. **Об'єм виробничої перевірки** дволітка коропа у кількості 100 екз.
(голів, тонн та ін.)
9. **Терміни проведення** липень 2019 року
(рік, місяць, початок і закінчення в кожному окремому випадку)
10. **Методика виробничої перевірки** Виробничу перевірку проведено в умовах ставків, на двох групах дволіток коропів уражених аеромонозом (контрольна і дослідна). Коропам дослідної групи згодовували «Флюмек» із розрахунку 150 мг на 1 кг комбікорму у комплексі з 5% меленим насінням

розторопші плямистої. Перед застосуванням препарат розводили у воді і додавали до комбікорму.

11. **З яким контролем проводилось порівняння закінчених досліджень** Тваринам контрольної групи згодовували стандартний комбікорм.

12. **Результати, що характеризують ефективність робіт, що перевіряють, у порівнянні з контролем:**

Результати ефективності проведеної роботи показали зменшення втричі загибелі риби; зменшення терміну перебігу захворювання на 20 %; загоєння виразок на тілі спостерігається на 5-й день, риби повністю одужали, а виразки заросли сполучнотканинними рубцям и на 10-й день. У риб контрольної групи виразки на поверхні тіла залишились без змін, та спостерігали загибель риби.

(якість продукції, зниження собівартості та ін.)

13. **Що рекомендується для освоєння у виробництві** Для лікування риби, хворої на аеромоноз, рекомендовано застосовувати «Флюмек» із розрахунку 150 мг на 1 кг комбікорму у комплексі з 5% меленим насінням розторопші плямистої. Препарати розчиняють у воді і заливають у комбікорм або кормосуміш до повного поглинання розчину. Причому лікувальний корм готують в день згодовування рибі та застосовують упродовж 10-ти днів з одноденною перервою між п'ятиденками.

(коротка і чітка рекомендація виробництву)

14. **Відповідальні виконавці виробничої перевірки:**

а) від наукової установи:

Морміль Л.В., м.н.с. лабораторії іхтіопатології Львівської дослідної станції ІРГ НААН

Солопова Х.Я., аспірант лабораторії імунології Інституту біології тварин

(П. І. П., посада, підпис)

б) від виробництва (господарства): Петрів Б.В., головний рибовод.

(П. І. П., посада, підпис)

Акт складений

«12» липня 2019 р.

Додаток В (3)

Погоджено
Проректор з навчальної і виховної
роботи НУБіП України академік НААН
Кваша С.М.



Затверджено
Перший проректор НУБіП
України академік НААН
Ібатуллин І.І.

А К Т

**про використання / впровадження результатів
кандидатської дисертаційної роботи
у навчальному процесі**

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Стан антиоксидантної й імунної систем у коропів, уражених аеромонозом і сапролегніозом, та їх лікування», що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 03.00.04 «біохімія» виконано Солоповою Христиною Ярославівною впроваджено у навчальну програму при викладанні дисципліни «Біохімія».

Результати досліджень є важливими для вивчення впливу асоційованої інфекції аеромонозу із сапролегніозом на інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів та окисної модифікації протеїнів, стану системи антиоксидантного захисту та активності клітинної і гуморальної ланок імунітету риб прийняті для використання у навчальному процесі кафедри біохімії і фізіології тварин імені академіка М.Ф. Гулого факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Декан факультету ветеринарної
медицини НУБіП України,
д.б.н., професор, академік НААН

Цвіліховський М.І.

Завідувач кафедри біохімії
і фізіології тварин імені академіка
М.Ф. Гулого НУБіП України, д.вет.н., професор

Томчук В.А.

Додаток В (4)

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор
Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С.З. Гжицького
кандидат біологічних наук, доцент
Гурко І. Б.
2020 р.



КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

1. Викладені результати дисертаційній роботі здобувачки Інституту біології тварин НААН Солопової Христини Ярославівни на тему: «Стан антиоксидантної й імунної систем у коропів, уражених аеромонозом і сапролегніозом, та їх лікування», що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 03.00.04 «біохімія» використовуються у навчальному процесі кафедри біологічної та загальної біохімії Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.
2. Інформаційний лист щодо результатів досліджень за темою дисертаційної роботи здобувачки Інституту біології тварин Солопової Христини Ярославівни розглянуто і схвалено на засіданні кафедри біологічної та загальної біохімії Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького (протокол № 11 від 23.12. 20 р.).

Декан факультету ветеринарної медицини
Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С.З. Гжицького
к.вет.н., доцент

Стронський Ю. С.

Завідувач кафедри біологічної
та загальної біохімії
Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С. З. Гжицького
доктор біологічних наук

Грабовський С. С.

Додаток Г

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧКИ

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті в наукових фахових виданнях України:

1. **Солопова Х. Я.**, Віщур О.І. Гематологічні та мікробіологічні показники, стан природних механізмів захисту у коропа за дії препарату "Флюмек". *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки.* Львів, 2016. Т. 18, № 3(71). С. 100–104. (Дисертантка виконала експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, написала статтю). <https://doi.org/10.15421/nvlvet7123>
2. Антимікробна активність нового хіміотерапевтичного препарату на основі флюмеквіну щодо *Aeromonas Hydrophila* / **Х. Я. Солопова**, О. І. Віщур, Т.І. Стецько, Г.П. Угрин, О.І. Хом'як. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки.* Львів, 2017. Т. 19, № 82. С. 66–70. (Дисертантка брала участь у проведенні досліджень, статистично опрацювала отримані дані, написала статтю). <https://doi.org/10.15421/nvlvet8214>
3. **Солопова Х.Я.**, Віщур О.І. Рівень окиснювального пошкодження білків та інтенсивність процесів ПОЛ в організмі коропів, уражених аеромонозом, та за лікування препаратом «Флюмек». *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія «Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва».* Київ, 2018. Вип. 285. С. 351–359. (Дисертантка виконала експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, брала активну участь у аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті).
4. **Солопова Х. Я.** Природні механізми захисту коропових риб за ураження бактерійним аеромонозом і за дії синбіотичного препарату «Ентеронормін».

Біологія тварин. Львів, 2020, т. 22, №1. С. 46-49.
<https://doi.org/10.15407/animbiol22.01.046>

5. **Солопова Х.Я.,** Віщур О.І. Стан Т- і В-клітинної ланок імунітету коропів, уражених аеромонозом, та за лікування препаратом «Ентеронормін». *Науковий вісник ветеринарної медицини.* Біла Церква, 2020. № 1. С.40–46. (Дисертантка виконала експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, брала активну участь у аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті). <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2020-154-1-40-46>

6. **Солопова Х.Я.,** Віщур О.І., Кориляк М.З., Соловодзінська І.Є. Стан системи антиоксидантного захисту у гепатопанкреасі коропів за асоційованої інфекції аеромонозу з сапролегніозом. *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування.* 2020. № 6. С. 85-89. (Дисертантка виконала експериментальну частину досліджень, провела визначення активності ензимів, статистично опрацювала отримані дані, провела аналіз результатів, підготувала статтю до друку). <https://doi.org/10.31890/vttp.2020.06.15>

Патент України на корисну модель

7. Спосіб лікування аеромонозу коропа : декл. Патент на корисну модель № 144100, Україна / Віщур О.І., Пірус Р.І., **Солопова Х.Я.** № u201907735; заявл. 09.07.2019 ; опубл. 10.09.2020, Бюл. № 17, 4с. (Дисертант брала участь у проведенні дослідів, аналізі результатів досліджень, оформленні патенту)

Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Тези та матеріали конференцій:

8. Матвієнко Н.М., **Солопова Х.Я.,** Шепелевич В.І. Асоційована бактеріальна інфекція коропових риб. *Міжнародна наукова конференція «Досягнення та перспективи розвитку мікробіології»: Програма та збірник тез доповідей.* Сполом. Львів, 2016. С. 52–53. (Дисертантка брала участь в опрацюванні літературних джерел, оформленні та написанні тези)

9. **Солопова Х.Я.** Вплив препарату «Флюомек» на показники неспецифічної резистентності коропа. *Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини : матеріали XV Всеукр. наук.-практ. конф. (м. Львів, 8–9 груд. 2016 р.).* Львів, 2016. С. 188.
10. **Солопова Х.Я., Віщур О.І., Морміль Л.В.** Стан гуморальної ланки природної резистентності організму коропів за умов ураження аеромонозом і сапролегніозом. *Збірник матеріалів XVI Міжнародної науково-практичної конференції професорсько-викладацького складу, аспірантів і студентів «Актуальні проблеми ветеринарної медицини».* Київ, 2017. С.108. .
(Дисертантка виконала експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, оформила та написала тези)
11. **Солопова Х.Я.** Антибактеріальна дія препарату «Флюомек» щодо збудника аеромонозу коропів. *Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини: матеріали XVI Всеукр. наук.-практ. конф. (м. Львів, 8– 9 груд. 2017 р.).* Львів, 2017. С. 149.
12. **Солопова Х.Я., Віщур О.І.** Вплив препарату «Флюомек» і його комплексу з насінням розторопші плямистої на вміст загального білка та співвідношення окремих його фракцій у коропів, уражених аеромонозом. *Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини : матеріали XVII Всеукр. наук.-практ. конф. (м. Львів, 6– 7 груд. 2018 р.).* Львів, 2018. С. 137. (Дисертантка виконала експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, оформила та написала тези, представила матеріали на конференції у вигляді усної доповіді)
13. **Солопова Х.Я., Кориляк М.З., Добрянська О.П.** Вплив препарату «Ентеронормін» на систему антиоксидантного захисту у коропів, уражених аеромонозом. *«Молоді вчені у розв'язанні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини»: матеріали XVIII Всеукр. наук.-практ. конф., (м. Львів, 5-6 груд. 2019 р.).* Львів, 2019. С. 151. (Дисертантка виконала експериментальну частину досліджень, провела визначення активності ензимів, статистично опрацювала отримані дані, брала участь в

оформленні та написанні тези, представила матеріали на конференції у вигляді усної доповіді)

14. **Солопова Х.Я.,** Віщур О.І., Соловодзінська І.Є. Вплив препарату «Флюмек» і його комплексу з насінням розторопші на систему антиоксидантного захисту у коропів, уражених аеромонозом. *Збірник матеріалів II Міжнародної науково-практичної конференції "Сучасні проблеми раціонального використання водних біоресурсів" (м. Київ, 27-29 жовтня 2020 р.). Київ, 2020. С. 109-111. (Дисертантка виконала експериментальну частину досліджень, провела визначення активності ензимів, статистично опрацювала отримані дані, брала участь в оформленні та написанні тези)*

15. **Солопова Х.Я.** Стан Т- І В-клітинної ланок імунітету коропів за ураження аеромонозом та асоційованою інфекцією аеромонозу з сапролегніозом. *«Молоді вчені у розв'язанні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини»: матеріали XIX Всеукр. наук.-практ. інтернет-конференція. (м. Львів, 3-4 груд. 2020 р.). Львів, 2020. С. 104.*