



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2007117985/13, 28.04.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.04.2007

(45) Опубликовано: 10.11.2008 Бюл. № 31

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU C1, 2290794, 10.01.2007. RU A1,
94012504, 10.12.1995. SU A1, 244793, 01.01.1969.

Адрес для переписки:

414056, г.Астрахань, ул. Савушкина, д. 1, НПЦ
по осетроводству, "БИОС"

(72) Автор(ы):

Касаева Светлана Юрьевна (RU),
Судакова Наталия Викторовна (RU),
Савенкова Елена Николаевна (RU),
Островский Марат Валерьевич (RU),
Смирнов Михаил Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное унитарное
предприятие "Научно-производственный центр
по осетроводству "БИОС" ФГУП НПЦ "БИОС"
(RU)

(54) СПОСОБ РЕАБИЛИТАЦИИ РЫБ ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области ветеринарии. Способ включает инъекции иммуномодулятора рИЛ-2 в дозе 2 тыс.ед./кг массы тела рыбы, который разводят в 2,5-3,5 мл 0,65% стерильного физиологического раствора или воды для инъекций. Инъекции осуществляют однократно внутривенно в течение 3-4 минут в хвостовую вену непосредственно перед операцией. Или инъекции осуществляют в дозе 5 тыс.ед./кг массы тела рыбы двукратно подкожно непосредственно после

операции с интервалом 24 часа. При этом иммуномодулятор разводят в 1,0-1,5 мл 0,65% стерильного физиологического раствора или воды для инъекций. Способ позволяет улучшить реабилитацию, осуществить ее в более короткий срок, исключить токсичное воздействия лечебных препаратов, расширить арсенал средств, обеспечивающих получение экологически чистой рыбной продукции, способствует сохранению рыб маточного стада и повышению эффективности воспроизводства осетровых. 4 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 337 704** (13) **C1**

(51) Int. Cl.

A61K 38/20 (2006.01)

A01K 61/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2007117985/13, 28.04.2007**

(24) Effective date for property rights: **28.04.2007**

(45) Date of publication: **10.11.2008 Bull. 31**

Mail address:

**414056, g.Astrakhan', ul. Savushkina, d. 1,
NPTs po osetrovodstvu, "BIOS"**

(72) Inventor(s):

**Kasaeva Svetlana Jur'evna (RU),
Sudakova Natalija Viktorovna (RU),
Savenkova Elena Nikolaevna (RU),
Ostrovskij Marat Valer'evich (RU),
Smirnov Mikhail Nikolaevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe unitarnoe
predpriyatie "Nauchno-proizvodstvennyj tsentr
po osetrovodstvu "BIOS" FGUP NPTs "BIOS" (RU)**

(54) **METHOD OF POSTSURGERY REHABILITATION OF FISHES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; veterinary science.

SUBSTANCE: method includes "pИЛ"-2 immune-response modulating agent injections dosed 2 thousand units/kg of fish body weight diluted in 2.5-3.5 ml of 0.65% sterile physiologic saline or water for injections. Injections are carried out in single dose intravenously within 3-4 minutes in caudal vein directly prior to operation. Or injections are carried out twice in dose 5 thousand units/kg of fish body weight

hypodermically directly after operation every 24 hours. Thus immune-response modulating agent is diluted in 1.0-1.5 ml of 0.65% sterile physiologic saline or water for injections.

EFFECT: method allows for improved rehabilitation; for shorter term thereof; for excluded toxic influences of medical preparations; for extended range of agents and provided maintenance of brood stock fishes and for higher efficiency of sturgeon reproduction.

4 tbl, 2 ex

RU 2 337 704 C1

RU 2 337 704 C1

Изобретение относится к промышленному рыбоводству, например, к воспроизводству и/или товарному выращиванию рыб осетровых видов и их гибридов, и предназначено для реабилитации рыб после хирургического вмешательства.

5 Актуальность изобретения обусловлена значительным распространением в рыболовной практике хирургических вмешательств, например, прижизненного получения половых продуктов и/или прижизненного определения пола у производителей и особей ремонтных групп рыб осетровых видов и их гибридов.

10 Общеизвестен эффект использования химиопрепаратов для снижения риска инфицирования и ускорения заживления раневой поверхности шва, например, широкое внедрение в рыболоводство антибактериальных средств природного, полусинтетического и синтетического происхождения как с лечебной, так и с профилактической целью. Однако регулярное использование антибиотиков вызывает определенные негативные последствия: изменение микробиоценоза рыбы и воды, появление резистентных форм бактерий, а также остаточное содержание химических веществ в рыболовной продукции.

15 Известно применение иммуномодулятора Ронколейкин® в ветеринарии в качестве иммунокорректора (Наставление по применению иммуномодулятора Ронколейкин® разработано ООО БИОТЕХ, г.Санкт-Петербург). Ронколейкин® применяют для животных в качестве иммунокорректора при различных инфекциях, гнойно-воспалительных, кожных, онкологических заболеваниях, постоперационных осложнениях и их профилактики, 20 заболеваниях глаз и дыхательных путей, в качестве адъюванта вакцин. Однако способы и порядок его применения для холоднокровных животных, к которым относятся рыбы, отсутствуют.

Цель изобретения - экологически чистый способ реабилитации рыб после хирургического вмешательства, обеспечивающий устойчивый эффект.

25 Техническим результатом изобретения является применение иммуномодулятора для реабилитации рыб осетровых видов и их гибридов после хирургических вмешательств, используемых в рыболовной практике.

30 Технический результат достигается тем, что применение иммуномодулятора проводится путем инъекций лекарственной формы рекомбинантного интерлейкина-2 человека (в дальнейшем рИЛ-2) согласно изобретению, что обуславливает активную регенерацию тканей рыб, а также пролиферацию лимфоцитов и восстановление характерного для осетровых рыб лимфоцитарного профиля.

35 Экспериментальные работы с осетровыми рыбами разных возрастных групп проводились в период 2005-2006 гг. на производственной базе ФГУП «НПЦ «БИОС» (с.Икряное, Астраханской обл.).

Изучали действие рИЛ-2 на организм осетровых рыб: средний ремонт гибрида (2-40 годовики) - белуга × стерлядь (в дальнейшем бестер) после прижизненной диагностики пола операционным способом (лапаротомия), производители стерляди после прижизненного получения икры путем подрезания яйцеводов.

Способ реабилитации осуществляют следующим образом.

45 Инъекции рИЛ-2 проводят внутривенно (в хвостовую вену) - из расчета 2 тыс.ед. на 1 кг массы тела рыбы, однократно, в течение 3-4 мин, непосредственно перед или после операции; подкожно - из расчета 5 тыс.ед. на 1 кг массы тела рыбы, двукратно с интервалом 24 часа, непосредственно после операции.

Перед введением каждую расчетную дозу рИЛ-2 разводят 1,0-3,5 мл 0,65% стерильного физиологического раствора или воды для инъекций.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения.

50 В описанные выше технические решения могут быть внесены различные модификации, не выходящие за рамки сферы изобретения. Для более полной иллюстрации изобретения и подтверждения представлены примеры его реализации.

Пример 1. Инъекции рИЛ-2 2-х годовикам бестера после хирургического вмешательства при прижизненном определении пола методом лапаротомии.

Экспериментальные работы проводили с 26.04.05 по 22.06.05 г. на производственной

базе ФГУП «НПЦ «БИОС» (с. Икряное, Астраханской обл.).

Для постановки эксперимента использовались 4 группы рыб.

В группе «опыт 1» рыбам вводили рИЛ-2 в дозе 1 тыс.ед./кг массы тела; в группе «опыт 2» - 2 тыс.ед./кг.

5 Препарат вводили однократно внутривенно в хвостовую вену, медленно в течение 3-4 мин непосредственно перед операцией. Перед введением каждую расчетную дозу препарата разводили 2,5-3,5 мл 0,65% стерильного физиологического раствора или воды для инъекций.

10 В группе «контроль 1» после операции однократно внутримышечно вводили окситетрациклин пролонгированного действия, используемый в ветеринарии, в дозе 0,1 мл/кг массы тела.

Группа «контроль 2» была сформирована для оценки условий содержания и особи из этой группы не подвергались оперативному вмешательству.

15 Все особи имели индивидуальные метки. Мечение осуществлялось путем удаления латеральных жучек и пробиванием плавников. В течение всего периода эксперимента все рыбы находились под регулярным ихтиопатологическим наблюдением. Рацион рыб, а также условия их содержания не имели различий между контролем и опытом.

20 Перед введением препарата и оперативным вмешательством у всех особей определяли размерно-весовые показатели и проводили клинический осмотр по общепринятым в ихтиопатологии методикам. Взятие крови от рыб четырех групп осуществляли до введения рИЛ-2 и, соответственно, операции и через 15, 30, 45 суток после операции. Результаты применения инъекций рИЛ-2 для реабилитации рыб после хирургического вмешательства, а именно прижизненного определения пола методом лапаротомии, приведены в таблицах 1, 2, 3.

25

Доза и наименование препарата	Состояние шва в баллах	Всего рыб, экз.	Сутки		
			15	30	45
рИЛ-2 1 тыс.ед./кг (опыт 1)	-	10	-	4	8
	+		-	3	2
	++		3	2	-
	+++		7	1	-
рИЛ-2 2 тыс.ед./кг(опыт 2)	-	10	-	5	8
	+		-	3	2
	++		4	2	-
	+++		6	-	-
Окситетрациклин 0,1 мл/кг (контроль 1)	-	11	-	2	5
	+		2	1	6
	++		5	5	-
	+++		4	3	-

30

35

Примечание: (-) рубцевание разреза, снятие швов; (+) гиперемия тканей, отечность; (++) гиперемия тканей, отечность, выделение сукровицы; (+++) гиперемия тканей, отечность, выделение сукровицы, некроз тканей.

40 Из данных табл.1 следует, что применение иммуномодулятора путем инъекций рИЛ-2, разведенного в 2,5-3,5 мл 0,65% стерильного физиологического раствора или воды для инъекций из расчета 2 тыс.ед./кг массы тела и введенного однократно внутривенно в хвостовую вену, медленно в течение 3-4 мин, непосредственно перед операцией обуславливает активную регенерацию тканей рыб в постоперационный период.

45 Таким образом, клиническая картина операционных швов у бестеров, подвергнутых лапаротомии, подтверждает терапевтический эффект рИЛ-2 в дозе 2 тыс.ед./кг массы тела.

50 В таблице 2 представлены показатели лизосомально-катионного теста (ЛКТ) у бестеров в условиях эксперимента, которые указывают на восстановление фагоцитарной функции нейтрофильных гранулоцитов при использовании рИЛ-2 в дозе 2 тыс.ед./кг массы тела.

Вариант	сутки			
	0	15	30	45

рИЛ-2 1 тыс.ед./кг (опыт 1)	1,19±0,09	0,60±0,07	0,64±0,14	0,54±0,05
рИЛ-2 2 тыс.ед./кг(опыт 2)	1,31±0,07	0,58±0,06	0,50±0,05	0,70±0,06*
Окситетрациклин 0,1 мл/кг (контроль 1)	1,24±0,12	0,44±0,05	0,49±0,08	0,51±0,06
Контроль 2	0,99±0,06	1,05±0,09	0,84±0,09	0,94±0,03
Примечание: * достоверность различий по Стьюденту (p<0,05)				

5

В таблице 3 приведены показатели клеток белой крови бестеров в условиях эксперимента, которые указывают на активную пролиферацию лимфоцитов и восстановление характерного для осетровых рыб лимфоцитарного профиля.

10

Вариант	Сутки	Лимфоциты	Моноциты	Эозинофилы	Сегментоядерные нейтрофилы	Палочкоядерные нейтрофилы
1	2	3	4	5	6	7
рИЛ-2 1 тыс.ед./кг (опыт 1)	0	61,35±1,41	2,28±0,34	10,08±0,54	7,71±0,39	17,21±1,01
		65,20±1,84	2,00±0,41	8,85±0,70	8,90±1,04	15,05±1,76
		64,70±2,19	2,90±0,51	10,50±1,36	6,20±1,07	15,70±1,89
рИЛ-2 2 тыс.ед./кг (опыт 2)		63,36±1,50	2,18±0,40	9,32±1,18	6,73±0,77	18,41±2,17
Контроль 2						
Окситетрациклин 0,1 мл/кг (контроль 1)						
рИЛ-2 1 тыс.ед./кг	15	40,80±3,83	4,85±0,40	5,00±0,79	10,55±1,62	38,80±2,91
		46,95±4,07	3,40±0,46	5,25±0,90	10,85±1,99	33,55±3,10
		62,70±2,19	2,50±0,22	9,90±1,68	5,80±0,93	19,1±2,58
рИЛ-2 2 тыс.ед./кг		40,64±3,51	3,36±0,33	14,00±3,05	8,77±1,41	33,23±5,00
Контроль 2						
Окситетрациклин 0,1 мл/кг						
рИЛ-2 1 тыс.ед./кг	30	58,60±2,81	2,50±0,54	7,65±1,91	7,65±1,77	23,60±1,98
		57,75±4,35	3,10±0,71	6,75±1,09	8,35±2,11	24,05±3,18
		66,90±2,02	2,00±0,42	10,70±2,08	6,30±1,40	14,10±0,87
рИЛ-2 2 тыс.ед./кг		49,23±4,93	4,45±0,35	10,68±2,35	9,55±1,31	26,09±2,60
Контроль 2						
Окситетрациклин 0,1 мл/кг						
рИЛ-2 1 тыс.ед./кг	45	64,30±1,64	2,90±0,29	9,90±1,44	8,00±1,74	14,90±1,37
		65,35±1,34	3,50±0,40	9,70±1,07	8,40±0,39	13,05±1,12
		64,40±2,45	2,50±0,50	7,20±2,22	7,10±1,97	18,80±1,59
рИЛ-2 2 тыс.ед./кг		57,27±2,26	2,27±0,33	10,27±0,79	5,68±0,95	24,50±2,36
Контроль 2						
Окситетрациклин 0,1 мл/кг						

15

20

25

30

В начале эксперимента лейкограммы рыб находились в пределах физиологических норм и были относительно идентичны, так как достоверных различий не выявлено.

На пятнадцатые сутки наблюдается достоверное (p<0,05) перераспределение лимфоцитарного профиля в сторону нейтрофилии. На этом этапе выявляется преимущество применения иммуномодулятора по сравнению с антибиотиком. Если у рыб инъектированных рИЛ-2 наблюдается снижение доли эозинофилов, относительно первоначальных показателей, то у рыб инъектированных окситетрациклином (контроль 1), количество эозинофилов достоверно (p<0,05) превысило типичные показатели в 1,5 раза, что говорит об интоксикации организма, вызванной окситетрациклином (графа 5, табл.3).

На тридцатые сутки в лейкоцитарной формуле обнаружены процессы восстановления лимфоцитарного профиля. При этом выявлены достоверные различия (p<0,05) по количеству лимфоцитов у рыб из опытных вариантов и 1-й контрольной группой.

К сорок пятым суткам отмечен относительный баланс клеток белой крови опытных рыб, тогда как у рыб из 1-й контрольной группы, еще было достоверное (p<0,05) превышение количества палочкоядерных нетрофилов (графа 7, табл.3). Это свидетельствует о том, что в организме опытных рыб воспалительный процесс начался и закончился раньше по сравнению с оперированным контролем.

Следовательно, анализ лейкоцитарной формулы крови особей бестера подтверждает более раннее развитие воспалительной реакции на оперативное вмешательство и восстановление лимфоцитарного профиля у рыб опытных групп, инъектированных рИЛ-2.

Кроме того, при анализе среднесуточного темпа роста рыб особей инъекцированных рИЛ-2 в дозе 2 тыс.ед./кг выявлены значения на 21,4% выше по сравнению с рыбами контрольной группы.

5 Пример 2. Инъекции рИЛ-2 зрелым самкам стерляди после подрезания им яйцевода при прижизненном получении половых продуктов (икры).

Прижизненное получение икры осуществляется при помощи хирургического вмешательства, наиболее часто используемым из которых является подрезание яйцеводов. В обычной рыбоводной практике постоперационное воспаление в области яйцеводов и анального отверстия лечится внутримышечными инъекциями антибиотиков.

10 Экспериментальные работы проводили с 10.05.06 по 13.06.06 г. на производственной базе ФГУП «НПЦ «БИОС» (с.Икряное, Астраханской обл.). В эксперименте было задействовано 31 экз. стерляди. Все рыбы имели индивидуальные метки. Мечение осуществлялось цветными проволочными метками, которые закреплялись на первом костном луче грудных плавников, и пробиванием плавников.

15 Для постановки эксперимента использовались 3 группы рыб (производители стерляди), средняя масса которых составляла 1,47 кг. Для стимуляции одновременного созревания икры всем особям была сделана двукратная инъекция синтетического гормонального препарата (Сурфагон), применяемого в рыбоводной практике. В течение всего периода эксперимента рыбы трех групп находились под регулярным ихтиопатологическим
20 наблюдением. Кормовой рацион рыб, а также условия их содержания не имели различий между контролем и опытом.

Перед оперативным вмешательством у стерляди рыб определяли размерно-весовые показатели и провели клинический осмотр. Взятие крови от рыб трех групп осуществляли за 10 дней до оперативного вмешательства, непосредственно после получения половых
25 продуктов и через 7, 14 суток.

Особям стерляди группы "контроль" после операции не вводили каких-либо препаратов. В группе "опыт 1" рыбам после проведения операции (подрезание яйцеводов) вводили рИР-2 в дозе 5 тыс.ед./кг массы тела; группе "опыт 2" - 3 тыс.ед./кг.

30 Инъекции рИР-2 осуществляли подкожно, двукратно с интервалом 24 часа, непосредственно после операции и процедуры отбора крови из хвостовой вены.

Перед введением каждую расчетную дозу рИЛ-2 разводили в 1,0-1,5 мл 0,65% физиологического раствора.

В таблице 4 представлены показатели лизосомально-катионного теста (ЛКТ) у самок стерляди в условиях эксперимента.

35

Таблица 4 Показатели лизосомально-катионного теста (ЛКТ) у стерляди, у.е				
Вариант	сутки			
	-10	0	7	14
контроль	0,73±0,040	0,64±0,083	0,50±0,050	0,51±0,076
рИЛ-2 5 тыс.ед. × 2	0,65±0,043	0,67±0,052	0,77±0,067*	0,75±0,056*
40 рИЛ-2 3 тыс.ед × 2	0,68±0,093	0,70±0,091	0,54±0,070	0,52±0,077
Примечание: * достоверность различий по Стьюденту (p<0,05)				

Выявлена достоверность различий между показателями СЦК ЛКТ на 7 и 14 сутки после введения рИЛ-2 в дозе 5 тыс.ед./кг и других групп.

45 При рассмотрении лейкоцитарной формулы производителей стерляди выявлен характер протекания воспалительных процессов и восстановление лимфоцитарного профиля, аналогичный описанному в примере 1.

Кроме того, данные ихтиопатологического обследования свидетельствуют, что на 7, 14
50 сутки у группы 2 (доза 5 тыс.ед./кг) физиологическое состояние было лучше в сравнении с группой 1 (доза 3 тыс.ед./кг) и контролем, в которых за этот период наблюдалась гибель рыбы.

Таким образом, способ позволяет улучшить послеоперационную реабилитацию, осуществить ее в более короткий срок, исключить токсичное воздействие лечебных препаратов, расширить арсенал средств, обеспечивающих получение экологически чистой

рыбоводной продукции, способствует сохранению рыб маточного стада и повышению эффективности воспроизводства таких ценных рыб, как осетровые.

Формула изобретения

5 Способ реабилитации рыб после хирургического вмешательства, включающий инъекции иммуномодулятора рИЛ-2 в дозе 2 тыс.ед./кг массы тела рыбы, разводимого в 2,5-3,5 мл 0,65%-ного стерильного физиологического раствора или воды для инъекций, при однократном внутривенном введении в течение 3-4 мин в хвостовую вену непосредственно перед операцией или в дозе на одно инъекирование 5 тыс.ед./кг массы тела рыбы,
10 разводимого в 1,0-1,5 мл 0,65%-ного стерильного физиологического раствора или воды для инъекций при двукратном подкожном введении непосредственно после операции с интервалом 24 ч.

15

20

25

30

35

40

45

50