

ВПЛИВ АЦЕТАТУ СВИНЦЮ НА ГУМОРАЛЬНІ ФАКТОРИ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ КОРОПА

Прикарпатський національний університет
імені Василя Стефаника, Інститут природничих наук,
м. Івано-Франківськ

Проблема імунітету риб привертає велику увагу багатьох дослідників у зв'язку з роллю імунної системи в адаптаційних процесах до підвищеного антропогенного навантаження, забрудненням водою токсикантами різного роду та розробкою імунних біомаркерів для оцінки якості вод та токсичної дії полутантів на риб [1, 2, 3, 4].

Одним з головних та небезпечних забруднювачів водного середовища є важкі метали [2]. Вони порушують екологічну рівновагу, через токсичний стрес спричиняють різноманітні пошкодження функціонального стану гідробіонтів, погіршують товарні якості риб [5]. Механізм дії іонів важких металів базується на їх здатності утворювати в живих тканинах стійкі зв'язки із сіркомісткими лігандами, джерелами яких можуть бути білки та низькомолекулярні тіоли [1].

Свинець надходить у природні водойми в розчиненому та сорбованому станах. У розчинній формі зустрічається у вигляді мінералів та органо-мінеральних комплексів, а також простих іонів, в нерозчинному — у вигляді сульфідів, сульфатів та карбонатів [6].

Токсичність свинцю (Pb) дещо нижча у порівнянні з іншими важкими металами (ртуттю, міддю, кадмієм), однак є достатньо високою. Встановлено, що токсикологічним показником шкідливості є концентрація 0,01 мг/л [6]. Вже при концентраціях 0,1-0,4 мг/л Pb спостерігаються симптоми отруєння. У риб Pb накопичується в зябрах, печінці, кишечнику, м'язах. Є відомості, що риби здатні реагувати на токсичні концентрації свинцю та уникати їх [5].

Реакція неспецифічної імунної відповіді клітинного та гуморального типів на екотоксиканти у риб вивчена значно менше, ніж у вищих тварин [7].

Зокрема, вплив свинцю на імунну систему вивчений недостатньо. Є окремі повідомлення про зниження стійкості та зростання смертності у риб, що були заражені різного роду мікроорганізмами та вірусами після того, як піддавались дії іонів даного металу. Встановлено, що за умов перебування коропів у воді з підвищеними концентраціями свинцю відбувається зміна загальної кількості лейкоцитів, відсоткового вмісту нейтрофілів та лімфоцитів. Ці показники зазнають змін в організмі риб навіть після виходу із забрудненого свинцем середовища [8]. Окрім кількісних свинець викликає і функціональні зміни у лейкоцитів [4]. Іони свинцю також зумовлюють зміни і в гуморальному імунітеті. При наявності цього металу в середовищі зростає продукція цитокінів, зокрема інтерлейкіну-6 та γ -інтерферону [7].

Важливу роль на початкових етапах формування захисних реакцій риб відіграють білки гострої фази — С-реактивний білок, фібриноген, транспортні білки (трансферин, церулоплазмін). Вони посилюють активність природних кілерів, лімфоцитів та макрофагів. Під впливом імуностимуляторів активність церулоплазміну зростає і залишається високою впродовж 5 тижнів після застосування препаратів [9].

Метою нашої роботи було встановити зміни деяких гуморальних показників природної резистентності риб у відповідь на короткотривалу дію підвищених концентрацій іонів свинцю.

Матеріали та методи

У ході експерименту використано 20 особин *Syrprinus carpio* L. обох статей масою 248-275 г та довжиною 23,0-26,5 см. Експеримент проводили в зимовий (січень-лютий) та літній (липень) періоди. Риб адаптували до умов у відстояній водопровідній воді з аерацією протягом 96 год. Концентрація кисню у воді становила $7,3 \pm 0,3$ мг/л, температура води — $19 \pm 2^{\circ}\text{C}$, рН — 7,0-7,4. Контрольних особин ($n=6$) витримували 96 год у звичайних умовах акваріуму. Дослідних риб ділили на 2 групи, кожна з яких витримували у воді з різною концентрацією ацетату свинцю ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \times 3\text{H}_2\text{O}$): концентрація Pb^{2+} становила 0,2 та 0,5 мг/л. Риб витримували за цих умов аналогічний контролю проміжок часу — 96 годин. Гранично допустима концентрація (ГДК) свинцю у воді для гідробіонтів є рівною 0,1 мг/л. Таким чином, використані концентрації токсиканту становлять 2 і 5 ГДК.

Кров забирали із хвостової вени риб за допомогою шприца. Прокол проводили в місці перетину бічної лінії та перпендикуляру, опущеного до неї від передньої частини анального плавника [10]. Сироватку відстоювали в термостаті (37°C) протягом 2-3 год.

Активність церулоплазміну та показник насичення трансферину залізом (Птр) визначали за методом Г.А. Бабенка [11] з вимірюванням оптичної густини на Specord M 400 при 530 нм.

Концентрацію фібриногену в крові визначали за масою згустку, який утворювався після 1 год інкубації при кімнатній температурі плазми (отримували центрифугуванням протягом 15 хв при 1500 об/хв крові з 1,34 % шавелево-кислим натрієм у співвідношенні 9:1) з 0,5 % CaCl_2 . В результаті утворювався згусток, який зважували на торсійній вазі (мг). Концентрацію фібриногену (г/л) розраховували за формулою:

$$[\text{фібр}] = \text{маса згустку} \times 2,2$$

Концентрацію С-реактивного білка визначали за стандартним "СРБ-латекс-тестом" ("Гранум" м. Харків) згідно з доданою інструкцією.

Бактерицидну активність сироватки крові визначали спектрофотометрично з додавання культури тест-бактерій (*E.coli*) [10].

Статистичну обробку даних виконали за допомогою комп'ютерної програми "MYNOVA". Дані подано як середнє \pm похибка середньої. Для знаходження вірогідної відмінності між досліджуваними групами використовували t-тест Стьюдента [12].

Результати та обговорення

Проведене дослідження впливу ацетату свинцю на гуморальні показники неспецифічної резистентності коропа показало, що вони є чутливими до низьких концентрацій іонів свинцю в середовищі. Результати експериментів показали значні зміни в активності та концентрації білків гострої фази у периферійній крові коропа *Surginus carpio* L.

Внаслідок перебування риб у середовищі з підвищеними концент-

раціями іонів свинцю (0,2 та 0,5 мг/л) показник насичення трансферину залізом був рівним 19 % і 23 %, що на 32 та 28 % менше, ніж у контролі. У контрольній групі цей показник становив 51 % (рис. 1). Активність церулоплазміну в контролі дорівнювала 4,38 у.о. Внаслідок дії обох доз токсиканту даний показник знизився в 1,8 та 1,7 раза порівняно з контролем (рис. 1).

На думку деяких авторів, церулоплазмін може виступати біомаркером токсичності іонів свинцю. Зі зростанням концентрації даного металу в сироватці крові відбувається зниження активності церулоплазміну [13]. В ході нашого експерименту також встановлено зниження активності церулоплазміну та показника насичення трансферину залізом. Можливо, це пов'язано з

тим, що і трансферин, і церулоплазмін здатні зв'язуватись із іонами свинцю, який блокує їх активні центри [14].

Встановлені зміни у концентрації фібриногену в сироватці крові коропа. У контрольній групі його концентрація становила 2,75 г/л. Після витримування риб у воді з токсикантом (0,5 мг Pb/л) вміст фібриногену вірогідно знизився у 2 та 2,2 раза в порівнянні з контролем та з іншою дослідною групою (0,2 мг Pb/л) відповідно (рис. 2). Разом з тим, підвищений вміст металу в середовищі зумовлював підвищення концентрації С-реактивного білка в сироватці крові коропа. Так, у контрольній групі риб його вміст дорівнював 1,8 мг/л, тоді як у дослідних — 3,6 та 3 мг/л відповідно (рис.2).

З даних літератури видно, що С-реактивний білок є особливо чутливим до дії різноманітних чинників. Зокрема, його вміст зменшувався в сироватці кольорової форелі після 45 хв дії перманганату калію. При витримуванні риб при температурі 16-19 °С цей показник є більшим, ніж у риб, які перебували у воді з температурою 13 °С [15]. Збільшення концентрації С-реактивного білка в 2,8 — 3,5 раза у сироватці коропа *Catla catla* спостерігалось через інтоксикації металом [16]. Отримані нами результати співпадають з даними літератури. С-реактивний білок, який є біомаркером запального процесу в організмі людини та ссавців, може виступати індикатором фізіологічного стану риб, які піддавались дії токсикантів [17].

Під впливом 0,5 мг/л іонів свинцю у водному середовищі відбувалося зниження активності мієлопероксидази в сироватці крові коропа в 1,5 раза порівняно з ефектом меншої дози токсиканту (0,2 мг/л) (рис. 3). Показник БАСК також знизився до 68 % при дії 0,2 мг/л іонів свинцю та до 74 % за умов впливу 0,5 мг/л металу. Це на 16,8 % та на 10,5 % менше, порівняно з контрольною групою особин, де він сягав 84,9 % (рис. 3).

Чутливими показниками до дії несприятливих факторів є мієлопероксидазна та бактерицидна активності сироватки крові риб [18]. За даними літератури показник БАСК відрізнявся у коропів, що зимували в різних умовах, зокрема, даний по-

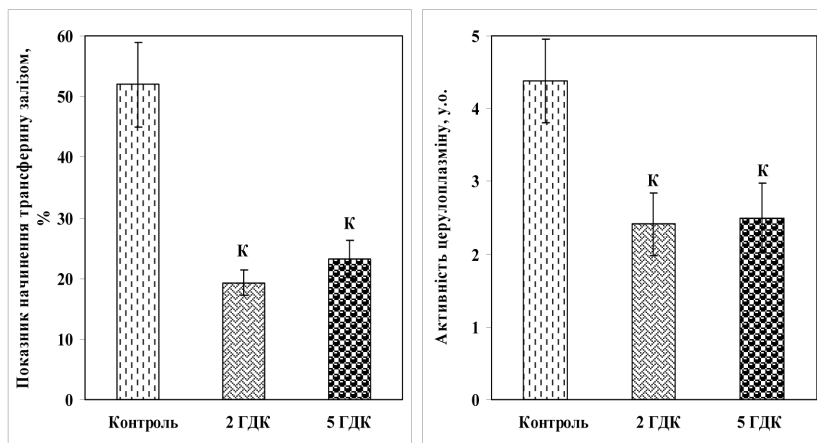


Рис. 1. Активність церулоплазміну та трансферину периферійної крові *Surginus carpio* L. у контролі та за умов дії ацетату свинцю. Концентрація Pb^{2+} 0,2 мг/л (2 ГДК) та 0,5 мг/л (5 ГДК). Дані представлені як середнє \pm його похибка (n=6). Надписи над стовпчиками означають вірогідну відмінність з вказаною групою, $P < 0,005$

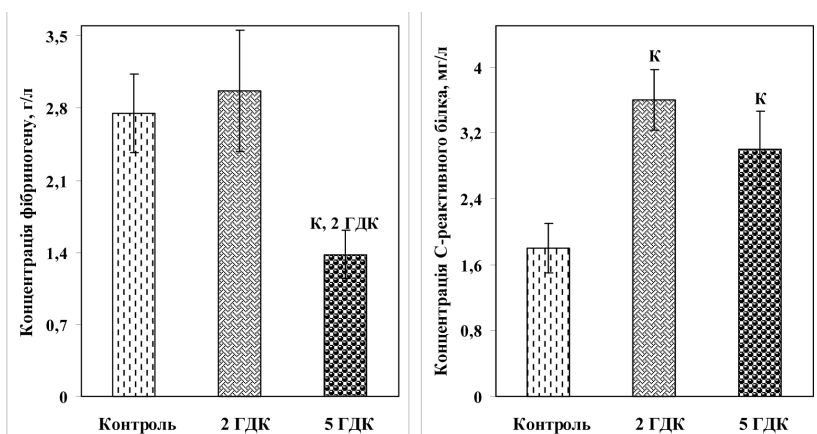


Рис. 2. Концентрація фібриногену та С-реактивного білка периферійної крові *Surginus carpio* L. у контролі та за умов дії ацетату свинцю. Концентрація Pb^{2+} 0,2 мг/л (2 ГДК) та 0,5 мг/л (5 ГДК). Дані представлені як середнє \pm його похибка (n=6). Надписи над стовпчиками означають вірогідну відмінність з вказаною групою, $P < 0,005$

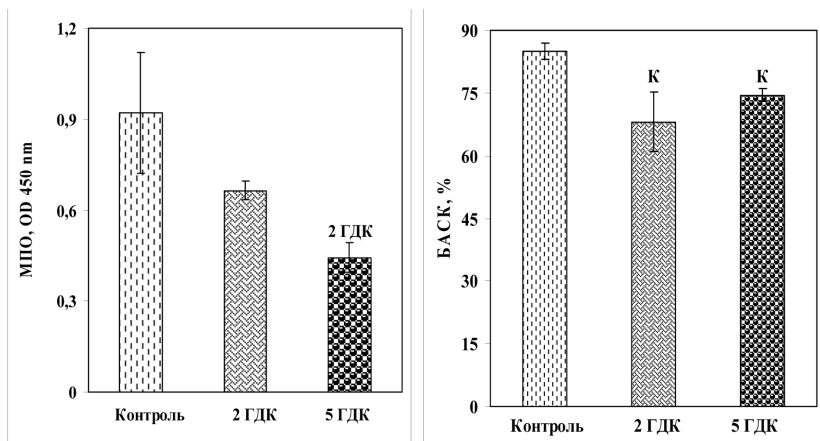


Рис. 3. Активність мієлопероксидази в сироватці крові та бактерицидна активність сироватки крові *Surginus carpio* L. у контролі та за умов дії ацетату свинцю. Концентрація Pb^{2+} 0,2 мг/л (2 ГДК) та 0,5 мг/л (5 ГДК). Дані представлені як середнє \pm його похибка ($n=6$). Надписи над стовпчиками означають вірогідну відмінність з вказаною групою, $P < 0,005$

казник був удвічі вишим у тієї групи риб, які в зимовий період перебували у ставку в порівнянні з особинами, які зимували в закритому ба-

сейні [18]. Згідно з отриманими результатами з'ясувалося, що іони свинцю в надлишкових концентраціях зумовлюють зниження дано-

го показника.

Під впливом обох концентрацій іонів свинцю відбувалося зниження титру гетерофільних антитіл у сироватці крові коропа *Surginus carpio* L. Даний показник зменшився вдвічі (1:4) у порівнянні з контролем, де становив 1:8. Зі збільшенням концентрації іону свинцю у воді до 0,5 мг/мл активність знизилась до 36 Од/мл, що в 4,5 рази менше, ніж у контролі. Дослідженнями закордонних авторів встановлено, що внаслідок дії важких металів концентрація лізоциму в сироватці крові зростає [9]. Однак, дослідники не вивчали активності даного ферменту.

Результати нашого дослідження дають уявлення про токсичні ефекти іонів свинцю на організм риб. Зокрема, нами встановлено, що даний токсикант окрім гематологічних та неврологічних ефектів, також може вражати і гуморальну ланку імунітету риб.

ЛИТЕРАТУРА

1. Заботкина Е.А. Влияние тяжелых металлов на иммунофизиологический статус рыб / Е.А. Заботкина, Т.Б. Лапирова // Успехи соврем. биологии. — 2003. — Т. 123, №4. — с. 401 — 408.
2. Пилипенко Ю.В. Оцінка харчової якості риб-біомеліораторів на вміст важких металів / Ю.В. Пилипенко // Гидробиол. журн. — 2007. — Т. 43, № 5. — С. 64 — 77.
3. Трахтенберг И.М. Свинец и другие тяжелые металлы во внешней среде после Чернобыльской катастрофы (к экологической ситуации в Украине) / И.М. Трахтенберг, В.М. Шестопалов, М.В. Набока, О.А. Бобылева // Междунар. мед. журн. — 1998. — № 3. — С. 94 — 98.
4. Jung D. Immunotoxicity of co-exposure to heavy metals: in vitro studies and results from occupational exposure to cadmium, cobalt and lead / D. Jung, U. Bolm-Audorff, A. Faldum, J.G. Hengstler, D.I. Attia, K. Janssen, M. Reifenrath, H.-G. Bienfait, O. Mayer-Popken, J. Konietzko // EXCLI J. — 2003. — Vol. 2. — P. 1611 — 2156.
5. Филенко О.Ф./ Основы водной токсикологии. О.Ф. Филенко, И.В. Михеева — М.: Колос. — 2007. — 144 с.
6. Гидрохимические показатели состояния окружающей среды: справочные материалы / [Под. ред. Т.В. Гусевой]. — М.: ФОРУМ: ИНФРА-М, 2007. — 192 с.
7. Kolman H. Influence of O-antigen *Aeromonas salmonicida* on non-specific and specific immune responses in siberian sturgeon, *Acipenser baeri* Brandt / H. Kolman, A.K. Siwicki, R. Kolman // Arch. Ryb. Pol. — 1999. — Vol. 7, №1. — P. 93 — 102.
8. Witeska M. Stress in fish — hematological and immunological effects of heavy metals / M. Witeska // Electr. J. Ichthyol. — 2005. — Vol. 3, № 1. — P. 35 — 41.
9. Some humoral effects in siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) after lysozyme dimmer application in bath / Kolman H., Kolman R., Siwicki A.K., Szczepkowska B. // Arch. Ryb. Pol. — 2000. — Vol. 8, №2. — P. 171 — 180.
10. Селиверстов В.В. Методические указания по проведению гематологического обследования рыб / В.В. Селиверстов. — Москва. — 1999 — 38 с.
11. Бабенко Г.А. Микроэлементы в экспериментальной и клинической медицине. / Г.А. Бабенко. — Киев, 1965. — 183 с.
12. Brooks S. P. J. A simple computer program with statistical test analysis of enzyme kinetics / S.P.J. Brooks // Bio Techniques. — 1992. — P. 906 — 911.
13. Leelakunakorn W. Ceruloplasmin oxidase activity as a biomarker of lead exposure / W. Leelakunakorn, R. Sriworawit, S. Soontaros // J. of Occupat. Health. — 2005. — Vol. 47, № 1. — P. 56 — 60.
14. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* / Martinez C.B.R., Nagae M.Y., Zaia C.T.B.V., Zaia D.A.M. // Braz. J. Biol. — 2004. — Vol. 64, № 4. — P. 797-807.
15. Changes of C-reactive protein levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sera after exposure to antiectoparasitic chemicals used in aquaculture / Kodama H., Matsuoka Y., Tanaka Y., Liu Y., Iwasaki T., Watarai S. // Fish & Shellfish Immunology. — 2004. — Vol. 16, № 5. — P. 589-597.
16. Paul I. Effect of environmental pollutants on the c-reactive protein of a freshwater major carp, *Catla catla* / I. Paul, C. Mandal, C. Mandal // Developmental * Comparative Immunology. — 1998. — Vol. 22, № 5 — 6. — P. 519 — 532.
17. Inflammatory interactions in fish exposure to pollutants and parasites: a role for apoptosis and C reactive protein / Hoole D., Lewis J.W., Schuwerack P.M.M., Chakravarthy C., Shrive A.K., Greenhoegh T.J., Cartwright J.R. // Parasitology. — 2003. — Vol. 126. — P. 71 — 85.
18. Микряков В.Р. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды / В.Р. Микряков, Л.В. Микрякова, Е.А. Заботкина — М.: Наука, 2001. — С. 3 — 103.

С.И. Даныливі, М.А. Мазепа

ВЛИЯНИЕ АЦЕТАТА СВИНЦА НА ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КАРПА

Представлены результаты исследования влияния повышенных концентраций ионов свинца (0,2 и 0,5 мг/л) на некоторые гуморальные факторы неспецифической резистентности карпа *Cyprinus carpio* L. В результате действия обеих доз токсиканта снижались: показатель насыщения трансферина железом, активность церулоплазмينا, концентрация фибриногена, бактерицидная активность сыворотки крови, титр гетерофильных антител, активность лизоцима в сыворотке крови, активность миелопероксидазы в сыворотке крови. Однако обе дозы металла обусловили рост концентрации С-реактивного белка в сыворотке крови.

Ключевые слова: влияние, свинец, кровь, резистентность

S.I. Danyliy, M.A. Mazepa

INFLUENCE PLUMBOUS ACETATE ON THE SOME HUMORAL FACTORS OF UNSPECIFIC RESISTANCE OF CARPIO

The research results of influencing of the promoted concentrations of lead ions (0,2 and 0,5 mg/l) on some humoral factors of unspecific resistance of carp *Cyprinus carpio* L. are presented. As a result of action of both toxicant doses went down: an index of saturation transferrine iron, activity of ceruloplasmin, concentration of fibrinogen, bactericidal activity of blood serum, titre of natural antibodies, activity of lysozyme in the blood serum, activity of myeloperoxidase in the blood serum. However, both doses of metal stipulated growth of concentration of C-reactive protein in the blood serum.

Key words: influence, lead, blood, resistance