

ВПЛИВ СВИНЦЮ НА ІМУНОБІОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ CYPRINUS CARPIO L.

М. Я. Онисковець, В. В. Снітинський

Львівський національний аграрний університет

У статті представлено результати досліджень впливу підвищених концентрацій ацетату свинцю на імунобіологічні показники коропа лускатого. Встановлено, що під впливом катіонів свинцю (0,2 та 0,5 мг/л) у крові дослідних груп риб після 96-годинної інкубації істотно збільшується рівень циркулюючих імунних комплексів та відбувається вірогідне зростання ступеня ендогенної інтоксикації за показниками МСМ та активністю ферментів аміотрансфераз (АлАТ, АсАТ).

Ключові слова: СВИНЕЦЬ, ІМУННА СИСТЕМА, CYPRINUS CARPIO L., ІМУНОБІОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ, ЕНДОГЕННА ІНТОКСИКАЦІЯ

У регуляції функціонального стану імунної системи риб значна роль належить техногенним впливам на середовище їх проживання [1, 2]. Імунітет риб, на відміну від вищих хребетних, значною мірою залежить від зовнішніх впливів, і умови середовища існування представляють собою активні регулятори імунореактивності риб. У зв'язку з цим показники імунного статусу риб виступають чутливими біомаркерами для моніторингу імунотоксичності хімічних забруднювачів [3–6]. Як відомо з літературних джерел, до числа найбільш небезпечних забруднювачів водного середовища відносять важкі метали, зокрема свинець [7, 8]. У літературі є окремі повідомлення про зниження імунного статусу та зростання смертності у риб, що були заражені різного роду мікроорганізмами та вірусами після того, як піддавались дії йонів цього 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 [9, 10]. Реакція неспецифічної імунної відповіді клітинного та гуморального типів на важкі метали у риб вивчена значно менше, ніж у вищих тварин [11]. Зокрема, вплив свинцю на імунну систему вивчений недостатньо [10]. До теперішнього часу є обмежена кількість публікацій щодо аналізу змін циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) в крові і тканинах риб [12]. Щодо змін показників ендогенної інтоксикації при дії важких металів, то є досить багато суперечливих даних.

Метою нашої роботи було дослідити в експерименті деякі імунобіологічні показники коропа лускатого (*Cyprinus carpio* L.) у відповідь на короткотривалу дію підвищених концентрацій йонів свинцю.

Матеріали і методи

В дослідженнях використовували дворічні особини коропа лускатого (*Cyprinus carpio* L.) середньою масою 300–410 г. Досліди проводили в резервуарах об'ємом 200 л з розрахунку 40 л на одну особину. Дослідних риб адаптували до умов протягом 2 діб. У кожную експериментальну групу було включено по 5 особин (n=5). Підвищений вміст йонів свинцю (Pb^{2+}) створювали внесенням розчину солі ацетату свинцю $(CH_3COO)_2Pb \times 3H_2O$ у концентрації 0,2 та 0,5 мг/л, що відповідають 2 та 5 гранично допустимим концентраціям (ГДК). Риб витримували в токсичному середовищі 96 годин. Контрольну групу риб витримували аналогічний термін у звичайних умовах, без додавання солей металів. Здійснювали постійну аерацію і підтримували температурний режим води на рівні 18–20 °С. Кров забирали за допомогою пастерівської піпетки з серця коропа.

У крові визначали рівень циркулюючих імунних комплексів в реакції преципітації з поліетиленгліколем (ПЕГ) [13].

Для дослідження стану ендогенної інтоксикації проводили спектрофотометричне визначення вмісту молекул середньої маси в сироватці крові коропа [14]. Визначення активності аланін- і аспартатамінотрансфераз (АлАТ, АсАТ) у сироватці крові проводили за допомогою стандартного набору «LACHEMA».

Статистичне опрацювання результатів проводили за допомогою програми «Statistik» (вірогідність розходжень між показниками оцінювали за критерієм Ст'юдента). Дані представлені як середнє $\pm$ похибка середнього.

Результати й обговорення

Приведені експериментальні дослідження впливу ацетату свинцю на імунобіологічні показники коропа лускатого показали, що вони є чутливими до низьких концентрацій йонів свинцю у водному середовищі. В ході досліджень встановлено достовірні зміни досліджуваних показників (табл.)

Таблиця

Показники імунобіологічного статусу організму коропа лускатого ($M \pm m$, $n=5$)

Показник		Групи тварин		
		Контрольна	Дослід І 2 ГДК	Дослід ІІ 5 ГДК
ЦІК, ммоль/л	високомолекулярні	17,0 $\pm$ 1,52	22,2 $\pm$ 2,15	31,4 $\pm$ 1,91****
	середньомолекулярні	39,4 $\pm$ 1,33	45,0 $\pm$ 1,41**	48,2 $\pm$ 2,2***
	низькомолекулярні	100,6 $\pm$ 5,02	106,2 $\pm$ 3,79	173,8 $\pm$ 2,27****
МСМ, у.о.		0,180 $\pm$ 0,0037	0,205 $\pm$ 0,0042***	0,223 $\pm$ 0,0036****
АлАТ, мккат/л		0,132 $\pm$ 0,0038	0,145 $\pm$ 0,0044	0,173 $\pm$ 0,0037****
АсАТ, мккат/л		0,166 $\pm$ 0,0038	0,191 $\pm$ 0,0047***	0,208 $\pm$ 0,0063****

Примітка: Вірогідність відмінностей у порівнянні з відповідними показниками у контролі: ** — $p < 0,025$; *** — $p < 0,01$; **** — $p < 0,001$

Для з'ясування фізіолого-біохімічних механізмів впливу свинцю на стан імунної системи досліджували вміст високо-, середньо- та низькомолекулярних циркулюючих імунних комплексів в сироватці крові піддослідних риб. 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 [2]. Відомо, що імунні комплекси антиген-антитіло є одним з продуктів формування імунної відповіді організму. Вони здатні впливати на функцію Т- і В-лімфоцитів, макрофагів і таким чином, брати участь у регуляції імунної відповіді за принципом зворотного зв'язку. Утворення ЦІК є одним з етапів ефекторної імунної відповіді, що спрямована на видалення антигенів з організму [15, 16].

Після 96-годинної інкубації коропів у токсичному середовищі відмічено зростання концентрації всіх класів ЦІК в обох дослідних групах проти контрольних. Найбільш вірогідні значення отримані при вивченні класу середньомолекулярних ЦІК у відповідь на дію обох доз токсиканта (0,2 та 0,5 мг/л), що становили відповідно 45,0 $\pm$ 1,41 і 48,2 $\pm$ 2,2 у. од. проти контролю — 39,4 $\pm$ 1,33 у. од. Таким чином, ми спостерігали вірогідне збільшення концентрації середньомолекулярних ЦІК у 1,14 раза при 2 ГДК ($p < 0,025$), та відповідно в 1,22 раза при 5 ГДК ($p < 0,01$). Щодо решти ЦІК, то вірогідні зміни ($p < 0,001$) було відмічено лише при концентрації свинцю 0,5 мг/л.

Як свідчать дані літератури, важкі метали здатні викликати формування аутоімунних реакцій, у зв'язку з чим збільшення ЦІК в сироватці крові може свідчити про розвиток аутоімунного процесу. Аналізуючи отримані результати та дані літератури, ми припускаємо, що збільшення кількості ЦІК у крові під впливом свинцю може бути обумовлено не тільки синтезом антитіл, а й порушенням механізмів їх елімінації. Таким чином, виявлені зміни показників різних класів ЦІК в крові коропа при свинцевій інтоксикації ймовірно обумовлені ефектами імунотоксичної дії важких металів, що відповідно може впливати на стан та механізми розгортання адаптаційних реакцій в організмі піддослідних тварин [17].

Ступінь ендогенної інтоксикації організму коропа лускатого оцінювали за вмістом молекул середньої маси (МСМ) та активністю ферментів амінотрансфераз в сироватці крові. Як відомо, молекули середньої маси володіють різною біологічною активністю: порушують йонну проникність біомембран, інгібують ферментні системи, зв'язують важливі білки і в тому числі відіграють провідну роль у розвитку ендогенної інтоксикації [17]. Під впливом йонів свинцю спостерігалось збільшення концентрації МСМ в сироватці крові в дослідних групах при 2 ГДК — у 1,12 раза ($p < 0,01$), при 5 ГДК — у 1,24 раза ($p < 0,001$) порівняно до контролю. Таким чином, можна стверджувати про вірогідне зростання ступеня ендогенної інтоксикації в організмі риб при короткотривалій дії солей свинцю. Крім цього, зростання рівня МСМ в крові може свідчити про зміну гомеостазу організму в бік посилення катаболічних процесів, а саме ферментативної активності ендопептидаз [18].

Після дії свинцю спостерігали зростання активності досліджуваних ферментів, що становило відповідно для АлАТ — $0,145 \pm 0,0044$ (2 ГДК) і $0,173 \pm 0,0037$ (5 ГДК) проти контролю — $0,132 \pm 0,0038$ мккат/л; для АсАТ — $0,191 \pm 0,0047$ ($p < 0,01$) і $0,208 \pm 0,0063$ ($p < 0,001$) проти контролю — $0,166 \pm 0,0038$ мккат/л. Отримані дані можуть вказувати на токсичне ураження печінки *Cyprinus carpio*, оскільки відомо, що одним із ефектів впливу свинцю на живий організм є його гепатотоксична дія, яку пов'язують з високим тропізмом металу стосовно гепатоцитів [19].

Висновки

1. Внаслідок 96-годинного впливу йонів свинцю в концентраціях 0,2 та 0,5 мг/л встановлено зростання всіх класів ЦІК у сироватці крові *Cyprinus carpio* L., що може бути обумовлено імунотоксичним ефектом важкого металу.

2. Встановлено зростання концентрації МСМ та активності ферментів аланін- і аспартатамінотрансфераз (АлАТ, АсАТ), що свідчить про значну ендогенну інтоксикацію в організмі піддослідних риб у відповідь на дію підвищених концентрацій ацетату свинцю.

Таким чином, результати нашого дослідження розширюють уявлення про імунотоксичні ефекти йонів свинцю, а приведена динаміка досліджуваних імунобіологічних показників свідчить про порушення імунологічних функцій в організмі експериментальних риб.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження в цій галузі будуть спрямовані на розкриття механізмів токсичного впливу йонів важких металів на імунітет риб та пошук критеріїв ранньої діагностики їх несприятливого впливу, що можуть служити вирішенням практичних завдань у промисловому рибористві.

М. Ya. Onyskovets, V. V. Snitinskiy

EFFECT OF LEAD ON IMMUNOBIOLOGICAL INDICES OF CYPRINUS CARPIO L.

S u m m a r y

The paper presents results of studies of increased concentrations of lead acetate on immunobiological indices of carp. We showed that under the influence of lead cations (0,2 and 0,5 mg/L) in blood of the tested groups of fish after 96-hour incubation significantly increased the

level of circulating immune complexes as well as increase of the endogenous intoxication degree in terms of MWM and aminotransferase activity of enzymes.

М. Я. Онисковец, В. В. Снитинский

ВЛИЯНИЕ СВИНЦА НА ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ *CYPRINUS CARPIO L.*

А н н о т а ц и я

В статье представлены результаты исследований воздействия повышенных концентраций ацетата свинца на иммунобиологические показатели карпа чешуйчатого. Установлено, что под влиянием катионов свинца (0,2 и 0,5 мг/л) в крови опытных групп рыб после 96-часовой инкубации существенно увеличивается уровень циркулирующих иммунных комплексов и происходит достоверное возрастание степени эндогенной интоксикации по показателям МСМ и активностью ферментов аминотрансфераз.

1. *Agbede S. A.* Ultrastructural study of the phagocytic activities of splenic macrophages in tilapia (*Oreochromis niloticus*) / S. A. Agbede, O. K. Adeyemo, O. B. Adedeji et al. // *African Journal of Biotechnology*. — 2006. — Vol. 5 (22). — P. 2350–2353.

2. *Вищур О. І.* Природна резистентність деяких видів риб / О. І. Вищур, І. В. Кичун, Н. М. Лешовська та ін. // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин УААН і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. — Львів, 2008. — Вип. 9, № 3. — С. 343–348.

3. *Bols N. C.* Ecotoxicology and innate immunity in fish / N. C. Bols, J. T. Brudachen, R. C. Ganssop et al. // *Development and Comparative Immunology*. — 2001. — Vol. 25. — P. 853–879.

4. *Zelikoff J. T.* Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? / J. T. Zelikoff // *Toxicology*. — 1998. — Vol. 129 (1). — P. 63–71.

5. *Zelikoff J. T.* Immunotoxicity biomarkers in fish: development, validation and application for field studies and risk assessment / J. T. Zelikoff, E. Li, Y. Carlson, A. Raymond et al. // *Human and ecological risk assessment*. — 2002. — Vol. 8 (2). — P. 253–263.

6. *Driver C. J.* Ecotoxicity literature review of selected Hanford site contaminants / C. J. Driver. — USA, 1994. — 132 p.

7. *Пилипенко Ю. В.* Оцінка харчової якості риби-біомеліораторів на вміст важких металів / Ю. В. Пилипенко // *Гидробиол. журн.* — 2007. — Т. 43, № 5. — С. 64–77.

8. *Трахтенберг И. М.* Свинец и другие тяжелые металлы во внешней среде после Чернобыльской катастрофы / И. М. Трахтенберг, В. М. Шестопапов, М. В. Набока та ін. // *Международ. мед. журнал.* — 1998. — № 3. — С. 94–98.

9. *Witeska M.* Stress in fish — hematological and immunological effects of heavy metals / M. Witeska // *Electr. J. Ichthyol.* — 2005. — Vol. 3, № 1. — P. 35–41.

10. *Данилів С. І.* Вплив ацетату свинцю на гуморальні фактори неспецифічної резистентності коропа / С. І. Данилів, М. А. Мазепа // *Современные проблемы токсикологии*. — 2009. — № 3–4. — С. 53–56.

11. *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.

12. *Кузьминова Н. С.* Концентрация малых циркулирующих иммунокомплексов в сыворотке крови некоторых видов черноморских рыб : материалы III международной конф. с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» г. Петрозаводск, 22–26 июня 2010 г. — С. 96–98

13. *Чернушенко Е. Ф.* Иммунология и иммунопатология заболеваний легких / Е. Ф. Чернушенко, Л. С. Когосова. — Киев : Здоровья, 1981. — 199 с.

14. *Николайчик В. В.* «Средние молекулы» — образование и способы определения / В. В. Николайчик, В. В. Кирковский, В. М. Моин и др // Лаб. дело. — 1989. — N 8. — С. 31–33.
15. *Горина Л. Г.* Дифференциация антигенов в составе циркулирующих иммунных комплексов / Л. Г. Горина, Ю. В. Вульфович // ЖМЭИ. — 1996. — № 1. — С. 58–61.
16. *Ковальчук І. І.* Показники імунобіологічного статусу організму та продуктивності корів за умов згодовування сполук селену, йоду, кобальту і хрому / І. І. Ковальчук Р. С. Федорук, М. М. Хомин // Науковий вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини імені С. З. Гжицького. — 2007. — Т. 9, № 1 (33). — С. 80–84.
17. *Трахтенберг І. М.* Порівняльна характеристика нефротоксичних ефектів ртуті і свинцю при їх тривалій дії на організм щурів різного віку / І. М. Трахтенберг, С. П. Луговський, Н. М. Дмитруха та ін. // Актуальные проблемы транспортной медицины. — 2006. — № 2 (4). — С. 26–33.
18. *Ростока Л. М.* Вплив метіоніну на вміст середньо молекулярних пептидів в сироватці крові щурів з гострим гепатитом : І-ший національний з'їзд фармакологів України «Сучасні проблеми фармакології» / Л. М. Ростока. — Київ, 1995. — 146 с.
19. *Луговской С. П.* Накопление и распределение свинца в ультраструктурах гепатоцитов крыс / С. П. Луговской // Соврем. проблемы токсикол. — 2004. — № 1. — С. 22–26.

Рецензент: старший науковий співробітник лабораторії інтелектуальної власності та маркетингу інновацій, кандидат сільськогосподарських наук Пилипець А. З.