

## 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) в 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 амінотрансфераз (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 короїв 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 (ЦК) 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

У 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 кожну експериментальну групу було включено по 5 особин (n=5). Підвищений вміст йонів свинцю (Pb<sup>2+</sup>) створювали внесенням розчину солі ацетату свинцю (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Pb×3H<sub>2</sub>O у концентрації 0,2 та 0,5 мг/л, що відповідають 2 та 5 гранично допустимим концентраціям (ГДК). Риб витримували у 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 брали 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 ± 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. У ході досліджень встановлено достовірні зміни досліджуваних показників (табл.)

Таблиця

#### Показники імунобіологічного статусу організму коропа лускатого (M±m, n= 5)

Показник		Групи тварин		
		Контрольна	Дослід I 2 ГДК	Дослід II 5 ГДК
ЦІК, ммоль/л	високомолекулярні	17,0±1,52	22,2±2,15	31,4±1,91****
	середньомолекулярні	39,4±1,33	45,0±1,41**	48,2±2,2***
	низькомолекулярні	100,6±5,02	106,2±3,79	173,8±2,27****
МСМ, у.о.		0,180±0,0037	0,205±0,0042***	0,223±0,0036****
АлАТ, мккат/л		0,132±0,0038	0,145±0,0044	0,173±0,0037****
АсАТ, мккат/л		0,166±0,0038	0,191±0,0047***	0,208±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±1,41 і 48,2±2,2 у.од. проти контролю — 39,4±1,33 у.од. Таким чином, ми

спостерігали вірогідне збільшення концентрації середньомолекулярних ЦК в 1,14 раза при 2 ГДК ( $p < 0,025$ ), та, відповідно, в 1,22 раза при 5 ГДК ( $p < 0,01$ ). Щодо решти ЦК, 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 ЦК у сироватці крові може свідчити про розвиток аутоімунного процесу. Аналізуючи отримані результати та дані літератури, ми припускаємо, що збільшення кількості ЦК в крові під впливом свинцю може бути обумовлено не тільки синтезом антитіл, а й порушенням механізмів їх елімінації. Таким чином, виявлені зміни показників різних класів ЦК 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 [15].

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 з контролем. 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 ЦК у сироватці крові *Cyprinus carpio L.*, що може бути обумовлено імунотоксичним ефектом важкого металу.
2. Встановлено зростання концентрації МСМ та активності ферментів аланін- і аспаратамінотрансфераз (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 імунобіологічних показників свідчить про порушення імунологічних функцій в організмі експериментальних риб.

**Перспективи подальших досліджень.** Подальші дослідження у 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 рибництві.

**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 риби / 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. Ganssip [ 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. — 132p.
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.] // Междунар. 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 // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов : материалы III международной конф. с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов. 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. — 199с.
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 / Л. М. Ростока // Сучасні проблеми фармакології : І-ший національний з'їзд фармакологів України. — 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.

**Рецензент:** провідний науковий співробітник лабораторії екологічної фізіології та якості продукції, кандидат біологічних наук, с. н. с. Хомин М. М.

УДК 577.112.083

## ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ НАТИВНИХ КАЗЕЇНОВИХ МІЦЕЛ

*Л. А. Сторож, А. В. Юкало*

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

*Досліджено казеїнові міцели, виділені в системі «вода–білки молока–пектин».*

*За допомогою електронної мікроскопії розраховано середній частинковий діаметр міцел білкової фази, отриманої при розшируванні даної системи, та міцел знежиреного молока. Середній діаметр виділених міцел становив 23,60 нм, середній*