

ВПЛИВ АЦЕТАТУ СВИНЦЮ ТА БІХРОМАТУ КАЛІЮ НА АКТИВНІСТЬ ЛІЗОЦИМУ *CYPRINUS CARPIO L.*

С. І. Данилів, Н. М. Кепещук, М. А. Мазена

Прикарпатський національний університет ім. В. Стефаника

Досліджено активність лізоциму в слизу та сироватці крові коропа *Cyprinus carpio L.* у нормі та за умов підвищених концентрацій іонів свинцю та хрому у водному середовищі. Встановлено, що іони свинцю та хрому зумовлюють однакові зміни в активності лізоциму. Іони свинцю в концентрації 0,2 та 0,5 мг/л спричиняють зростання активності даного ферменту в слизу в 3,1 і 3,7 рази відповідно і його зниження в сироватці крові в 3,8 разів. Наявність хрому в середовищі також призводить до збільшення даного показника в слизу в 3,7 та 10 разів у порівнянні з нормою при концентраціях 1 та 2,5 мг Cr^{6+} /л і його зниженні в сироватці при концентрації іону металу 1 мг/л. з отриманих результатів видно, що іони досліджуваних металів зумовлюють зростання активності лізоциму в слизу та зниження її в сироватці крові *Cyprinus carpio L.*

Ключові слова: ЛІЗОЦИМ, *CYPRINUS CARPIO L.*, АЦЕТАТ СВИНЦЮ, БІХРОМАТ КАЛІЮ.

Лізоцим (мурамідіаза) є одним з найдавніших у філогенезі факторів протимікробного захисту. Синтезується макрофагами та моноцитами, надходить у рідинні субстрати — слиз, слину, кров, молоко людини та тварин Лізоцим також присутній у азурофільних гранулах та специфічних зернах нейтрофілів [1]. За хімічною структурою лізоцим — це катіонний білок, поліпептид [2]. Основою механізму дії лізоциму є його здатність розщеплювати мурамову кислоту шляхом розриву β -1,4-глікозидного зв'язку між N-ацетилмураміновою кислотою та N-ацетилглюкозаміном. Мурамова кислота є однією з важливих субодиниць пептидоглікану, який складає основу клітинної стінки грампозитивних бактерій. У результаті цього порушується цілісність клітинної стінки бактерій і вони стають чутливими до осмотичного шоку. Літична дія лізоциму значно підсилюється компонентами комплементу та гістонами [3]. Разом з тим, лізоцим ефективний також проти окремих штамів грам негативних мікроорганізмів, патогенних вірусів та грибів роду *Candida*. Він перешкоджає проникненню антигенів у внутрішнє середовище організму, стимулює фагоцитоз, підсилює кооперативні функції T-субпопуляцій лімфоцитів. Відіграє активну роль в нормальному метаболізмі шляхом участі в антиоксидантних процесах, перешкоджає вільнорадикальному окисленню [4], здатний реагувати з нуклеїновими кислотами та кислотними медіаторами запальних процесів [2].

Відомо, що важкі метали можуть модулювати активність лізоциму [5]. Важкі метали як екоотоксиканти вражають бокаловидні клітини на поверхні шкіри та зябер. За цих умов кількість клітин, що продукують слиз може зменшуватися (у коропа у відповідь на дію кадмію) чи збільшуватися (у атлантичної тріски у відповідь на дію непереробленої нафти). Разом з тим, встановлено, що у відповідь на дію іонів важких металів спостерігається збільшена секреція та накопичення слизу на поверхні тіла риб. При цьому змінюється його фізико-хімічний склад та активність компонентів [6]. Даних про зміну активності чи концентрації лізоциму в слизу риб як відповідь на дію свинцю та хрому в літературі недостатньо. Метою роботи було встановити ефект іонів свинцю та хрому (VI) на даний показник в слизу та сироватці крові *Cyprinus carpio L.*

Матеріали і методи

Для роботи використовували рибу *Cyprinus carpio L.*, виловлену з штучних водойм Прикарпаття. Експеримент проводили в зимовий період (січень-лютий). Риб адаптували до умов у відстояній водопровідній воді з аерацією протягом 96 год. Концентрація кисню у воді становила $7,1 \pm 0,1$ мг/л, температура води — 20 ± 1 °C, pH — 7,2. У роботі було використано

30 особин обох статей масою 250–265 г та довжиною 24,0–25,5 см. Контрольних особин (n=6) витримували 96 год у звичайних умовах акваріуму. Дослідних риб ділили на 4 групи, дві з яких витримували у воді з різною концентрацією ацетату свинцю ((CH₃COO)₂Pb×3H₂O): концентрація Pb²⁺ становила 0,2 та 0,5 мг/л; а дві інші групи — біхромату калію (K₂Cr₂O₇): концентрація Cr⁶⁺ — 1 та 2,5 мг/л. Риб витримували за цих умов аналогічний контролю проміжок часу — 96 год. Гранично допустима концентрація (ГДК) свинцю у воді для гідробіонтів дорівнює 0,1 мг/л, для хрому (VI) — 0,5 мг/л. Таким чином, використані концентрації токсиканту становлять 2 і 5 ГДК.

З тіла риби забирали слиз вздовж бічної лінії предметним скельцем. 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. Сироватку відстоювали в термостаті (37 °С) протягом 2–3 год. Для визначення активності ферменту слиз розводи в 10 разів, сироватку крові — в 4 рази. Визначення активності лізоциму проводили за допомогою турбодиметричного методу з використанням *Micrococcus flavus*. Тест-культуру бактерій вирощували при 27 °С 7 діб на рідкому середовищі (м'ясо-пептонному бульйоні, рН 6,5). Реакційна суміш містила рівні об'єми розведеного дослідного матеріалу (слиз, сироватка) та культури мікроорганізмів, оптична густина останніх D = 0,66 (в 1 мл розчину міститься 1×10⁹ клітин мікроорганізмів). Вимірювали оптичну густина через 18 та 180 с при довжині хвилі 540 нм на спектрофотометрі Specord M400 (Karl Zeiss, Jena) [7]. За одиницю активності приймали зміну оптичної густини на 0,001 [8].

Статистичну обробку даних зробили за допомогою комп'ютерної програми «MYNOVA». Дані подано як середнє ± похибка середньої. Для знаходження вірогідної відмінності між досліджуваними групами використовували t-тест Стьюдента [9].

Результати та обговорення

Під час вивчення впливу іонів свинцю та хрому на активність лізоциму в слизу та сироватці крові коропа *Cyprinus carpio* L. встановлено, що цей фермент у різних біологічних рідинах по-різному реагує на дані стрес-фактори. Візуальна оцінка поверхні тіла риб, що перебували у воді з підвищеними концентраціями іонів обох металів, показала суттєве збільшення кількості слизу в порівнянні з контролем.

Водночас внаслідок дії обох концентрацій (0,2 і 0,5 мг/л) іонів свинцю активність лізоциму в слизу зростає до 422 та 504 Од/мл (табл. 1). Порівнюючи ці дані з нормою (137,80 Од/мл), видно, що зміна активності відбулася у 3,1 та 3,7 разів відповідно.

Можна припустити, що з гіперсекрецією слизу у риб відбувається не лише збільшення концентрації сполук, що входять до його складу, але й зростає їх каталітична активність. Це підвищує стійкість організму до мікрофлори оточення.

Вихідна активність лізоциму в сироватці крові коропа була рівною 140 Од/мл. Після дії токсиканту в середовищі у концентрації 0,2 мг/мл впродовж 96 год даний показник знизився до 64 Од/мл. З подальших збільшення концентрації іону металу у воді до 0,5 мг/мл активність продовжувала знижуватись і досягла 36 Од/мл. Результати досліджень активності лізоциму в сироватці крові *Cyprinus carpio* L. (табл. 1).

З наведених даних видно, що при підвищенні концентрації іону металу спостерігається зниження активності лізоциму у порівнянні з нормою в 3,9 раза.

Таблиця 1

Вплив іонів свинцю на активність лізоциму *Cyprinus carpio* L.

Біологічна рідина	Активність лізоциму, Од/мл		
	Контроль	Концентрація іонів свинцю	
		2 ГДК (0,2 мг/л)	5 ГДК (0,5 мг/л)
Слиз	137,00 ± 23,34	422,00 ± 97,33*	504,00 ± 87,67*

Сироватка крові	140,00 ± 38,55	64,00 ± 17,00	36,00 ± 4,56*
-----------------	----------------	---------------	---------------

Примітка: * — вірогідна відмінність від контрольної групи, $P < 0,05$.
Дані представлені як середнє ± його похибка ($n = 6$).

Співзвучними є дані, що отримані в експерименті по визначенню впливу іонів шестивалентного хрому на активність лізоциму. Внаслідок 96 годинного перебування риб у воді з вмістом хрому (VI) в концентрації 1 мг/л відбувається збільшення активності лізоциму в слизу до 514 Од/мл, що в 3,7 рази вище від норми. Подальше збільшення концентрації токсиканту в середовищі до 2,5 мг/л зумовлювало ще вище зростання ферментативної активності в 10,6 разів відносно початкової (табл. 2).

Разом з тим, вплив іонів шестивалентного хрому на активність лізоциму в сироватці крові коропа був дещо іншим, ніж іонів свинцю. Вплив 1 мг/л хрому (VI) зумовлював зниження цього показника в 5,8 разів у порівнянні з нормою. Проте, вміст іонів хрому у концентрації 2,5 мг/л не спричиняв достовірних змін активності лізоциму відносно вихідної. Однак, цей показник збільшувався в 3 рази у порівнянні з нижчим вмістом металу у середовищі і становив 72,8 Од/мл (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив іонів хрому на активність лізоциму *Cyprinus carpio* L.

Біологічна рідина	Активність лізоциму, Од/мг		
	Контроль	Концентрація іонів хрому	
		2 ГДК (1 мг/л)	5 ГДК (2,5 мг/л)
Слиз	137,00 ± 23,34	514,00 ± 125,75*	1468,00 ± 501,10*
Сироватка крові	140,00 ± 38,55	24,00 ± 0,06*	72,80 ± 6,86

Примітка: * — вірогідна відмінність від контрольної групи, $P < 0,05$.
Дані представлені як середнє ± його похибка ($n = 6$).

Отримані результати про активність лізоциму в слизу та сироватці крові можуть свідчити, що використані концентрації іонів свинцю та хрому у водному середовищі, а також 96-и годинна дія іонів цих металів є достатніми факторами для його викиду з мононуклеарів шкіри, але недостатніми для даного процесу в мононуклеарах нирки, селезінки та печінки, які є основним джерелом лізоциму сироватки крові у риб.

Отримані результати відрізняються від результатів зарубіжних авторів, які досліджували інші метали. Так, ртуть, кадмій, цинк та селеніт спричиняли зростання концентрації лізоциму в сироватці крові при тривалій дії (30 днів) у кольорової форелі і голубих гурами. Також цей показник був чутливим до дії іонів важких металів і в органах риб (печінка, нирки) [6]. На думку деяких дослідників викид лізоциму — це реакція на стрес, що регулюється кортизолом [10]. Разом з тим необхідно зазначити, що дані автори не вивчали активності лізоциму, а лише його концентрацію.

Відомо чимало робіт стосовно дослідження активності лізоциму в сироватці крові за умов дії інших чинників. Наприклад, у різних видів риб у відповідь на дію імуномодуляторів [2, 11], бактеріальної інфекції [12, 13], стресу повітрям [14]. Всі вони демонструють зростання ферментативної активності відразу або через деякий час після дії відповідного агенту.

Висновки

1. Внаслідок 96-год впливу іонів свинцю в концентраціях 0,2 та 0,5 мг/л та хрому в концентраціях 1 та 2,5 мг/л активність лізоциму в слизу підвищується в 3,1-3,7 та 3,7–10 разів.

2. Активність лізоциму в сироватці крові знижується у відповідь на наявність іонів обох металів у середовищі. При збільшенні концентрації іонів свинцю до 0,5 мг/л цей показник знижується в 3,9 рази порівняно з нормою. При дії нижчої концентрації іонів шестивалентного хрому (1 мг/л) цей показник також знижується в 5,8 разів, але немає достовірної відмінності між активністю лізоциму в нормі та за умов дії цього токсиканту в концентрації 2,5 мг/л.

S. I. Danyliv, N. M. Kepeshchuk, M. A. Mazepa

ACTION OF LEAD ACETATE AND POTASSIUM DICHROMATE ON LYSOZYME ACTIVITY IN *CYPRINUS CARPIO* L.

S u m m a r y

It is explored activity of lysozyme at mucus and blood serum of the carp *Cyprinus carpio* L. in a norm and at presence of lead and chromium ions in a water environment. It is set that the ions of the explored metals caused the similar effects in lysozyme activity. The lead ions in concentration 0,2 and 0,5 mg/l draws increase of this enzyme activity at mucus in 3,1 and 3,7 times accordingly, and also decrease of this index in the blood serum 3,8 times. The presence of chromium ions in an environment cause increase of this index in mucus in 3,7 and 10 times (1 and 2,5 mg Cr⁶⁺/l) and decrease of it in serum at the concentration in 1 mg/l. It is evidently that the ions of the explored metals predetermine growth of lysozyme activity at mucus and decline of this index in the blood serum of *Cyprinus carpio* L.

С. И. Данылив, Н. М. Кепешчук, М. А. Мазена

ВЛИЯНИЕ АЦЕТАТА СВИНЦА И БИХРОМАТА КАЛИЯ НА АКТИВНОСТЬ АКТИВНОСТЬ ЛИЗОЦИМА У КАРПА *CYPRINUS CARPIO* L.

А н н о т а ц и я

Исследовано активность лизоцима в слизи и сыворотке крови карпа *Cyprinus carpio* L. в норме и при условиях повышенных концентраций ионов свинца и хрома в водной среде. Установлено, что ионы свинца и хрома предопределяют одинаковые изменения в активности лизоцима. Ионы свинца в концентрации 0,2 и 0,5 мг/л влекут рост активности данного фермента в слизи в 3,1 и 3,7 раза соответственно и его снижение в сыворотке крови в 3,8 раз. Наличие хрома в водной среде в концентрациях 1 и 2,5 мг Cr⁶⁺/л приводит к увеличению данного показателя в слизи в 3,7 и 10 раз по сравнению с нормой. При концентрации хрома 1 мг/л происходило снижение активности лизоцима в сыворотке. Из этого следует, что ионы исследуемых металлов предопределяют рост активности лизоцима в слизи и снижения ее в сыворотке крови *Cyprinus carpio* L.

1. *Якобисяк М.* Імунологія [Текст] / Якобисяк М. — Вінниця : Нова книга. — 2004. — 672с.

2. *Kolman H.* Some humoral effects in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) after lysozyme dimmer application in bath [Text] / Kolman H., Kolman R., Siwicki A. K., Szczepkowska B. // Archive of Polish Fisheries. — 2000. — V. 8. — P. 171–180.

3. *Вершигора А. Ю.* Імунологія [Текст] / Вершигора А. Ю. — Київ : Вища школа, 2005. — 599 с.

4. *Безкаравайний Б. О.* Етіотропна терапія та профілактика поверхневого кандидозу ротової порожнини у новонароджених та дітей раннього віку [Текст] / Безкаравайний Б. О., Сіротченко Т. А. // Здоровье ребенка. — 2007. — № 1. — С. 8–19.

5. *Oystein L.* Study on lysozyme activity in some fish species [Text] / Oystein L., Oystein E., Sorensen A., Froysada E. // Diseases of Aquatic Organisms. — 1989. — V. 6. — P. 1–5.

6. *Bols N. C.* Ecotoxicology and innate immunity in fish [Text] / Bols N. C., Brubachen J. T., Ganssip R. C., Lee L. E. J. // Development and Comparative Immunology. — 2001. — V. 25. — P. 853–879.
7. *Бабич Е. М.* Дифференциальная экспресс-диагностика бактериальных и вирусных менингитов с помощью лизоцимного теста [Текст] / Бабич Е. М., Деркан С. А., Васильева И. В. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 1992. — Т. 1. — С. 52–54.
8. *Noga E. J.* Comparative clinicopathological response of striped bass and palmetto bass to acute stress [Text] / Noga E. J., Wang C., Grindem C. B. // Trans. of the American Fisheries Society. — 1999. — V. 128. — P. 680–686.
9. *Brooks S. P. J.* A simple computer program with statistical test analysis of enzyme kinetics [Text] / Brooks S. P. J. // Bio Techniques. — 1992. — P. 906–911.
10. *Микряков В. Р.* Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды [Текст] / Микряков В. Р., Микрякова Л. В., Заботкина Е. А. — Москва : Наука, 2001. — 120 с.
11. *Kolman H.* The humoral effects of epin in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) [Text] / Kolman H. // Archive of Polish Fisheries. — 2001. — V. 9. — P. 61–69.
12. *Kolman H.* Influence of O-antigen *Aeromonas salmonicida* on non-specific and specific immune response in Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* Brandt [Text] / Kolman H., Siwicki A. K., Kolman R. // Archive of Polish Fisheries. — 1999. — V. 7. — P. 93–102.
13. *Stosik M.* Resistance in carp (*Cyprinus carpio* L.) affected by a natural bacterial infection [Text] / Stosik M., Deptula W., Trávniček M. // Vet. Med. Czech. — 2001. — V. 46. — P. 6–11.
14. *Palti Y.* Comparative study of biochemical and non-specific immunological parameters in two Tilapia species (*Oreochromis aureus* and *O. mossambicus*) [Text] / Palti Y., Tinman S., Cnaani A., Avidar Y., Ron M., Hulata G. // Bull Vet Inst Pulawy. — 2005. — V. 51. — P. 297–301.