

УДК 57.083.3+639.215.2+546.766

Данилів С.І., Мазепа М.А.

БІЛКИ “ГОСТРОЇ ФАЗИ” *CYPRINUS CARPIO L.* ЯК ЗАХИСНИЙ ФАКТОР НА ТОКСИЧНИЙ ВПЛИВ ШЕСТИВАЛЕНТНОГО ХРОМУ

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника,
м. Івано-Франківськ, Україна

Ключові слова: білки “гострої фази”, церулоплазмін, трансферин, С-реактивний білок, фібриноген, токсичність, *Cyprinus carpio L.*, хром

Хром використовується на промислових підприємствах та входить до складу речовин повсякденного вжитку. Є відомості про викиди відходів виробництва, які містять Cr^{6+} та Cr^{3+} , у ґрунтові води, ріки та озера, що спричиняє ураження водних екосистем та отруєння тварин [6, 11, 12].

Відомо, що у риб шестивалентний хром має здатність легко проникати крізь зяброві мембрани і швидко накопичується в різних тканинах, включаючи мозок, гастро-інтестинальний тракт, нирки, селезінку [3, 4]. Акумуляуючись у зябровій тканині, хром пошкоджує структуру зябрового епітелію, що спричиняє ураження дихальної та осморегуляторної функцій. Ці ефекти часто відносять до гострих механізмів токсичності металу. Високою є концентрація хрому і в печінці [11]. Водночас риби є більш стійкими до дії хрому, ніж інші гідробіонти.

Зміна концентрації чи активності так званих білків “гострої фази” – це реакція організму на локальне чи системне порушення у його гомеостазі, що може бути спричинене інфекцією, пошкодженням тканин, травмами чи імунними захворюваннями. До білків “гострої фази” належать: трансферин, церулоплазмін (мідь-оксидаза), С-реактивний білок, фібриноген тощо, їх відносять до вроджених складових імунної системи [13]. Ці білки можуть модифікувати функції клітин імунної системи, оскільки на мембрані останніх є рецептори до білків “гострої фази”. Встановлено також, що на поверхні лімфоцитів є ізоформи молекул церулоплазміну [8].

Церулоплазмін – мідь-вмісний фермент, що здатний запускати “гостро фазові” реакції за умов стресу [8]. С-реактивний білок описаний у багатьох видів риб (камбали, тріски), він посилює рухливість лейкоцитів, взаємодіє з комплементом, бере участь в лізисі клітин. До вродженої складової імунної системи відноситься також і

трансферин [2]. Він стимулює ранню стадію активації лімфоцитів, регулює синтез ДНК, підсилює активність природних кіллерів та проліферацію лімфоцитів [7]. Даних літератури щодо впливу хрому на білки “гострої фази” риб мало, тому метою нашої роботи було встановити зміни цих показників у крові *Cyprinus carpio* L. у відповідь на гостру дію підвищених концентрацій іонів шестивалентного хрому.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для постановки експерименту використано 20 особин *Cyprinus carpio* L. обох статей. Експеримент проводили в літній (липень) та осінній (листопад) періоди. Риб адаптували до умов у відстояній водопровідній воді з аерацією протягом 96 год. Концентрація кисню у воді становила $7,5 \pm 0,2$ мг/л. 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 біхромату калію ($K_2Cr_2O_7$): концентрація Cr^{6+} становила 1 та 2,5 мг/л. Риб витримували за цих умов аналогічний контролю проміжок часу – 96 годин. Гранично допустима концентрація (ГДК) шестивалентного хрому у воді для гідробіонтів є рівною 0,5 мг/л. Таким чином, використані концентрації токсиканту становлять 2 і 5 ГДК.

Кров забирали із хвостової вени риб [5] і відстоювали сироватку в термостаті ($37^{\circ}C$) протягом 2-3 год. Активність церулоплазміну та показник насичення трансферину залізом (Птр) визначали за методом Г.А. Бабенка [1] з вимірюванням оптичної густини на Specord M 400 при 530 нм. Концентрацію С-реактивного білка визначали за стандартним “СРБ-латекс-тестом” (“Гранум” м. Харків) згідно доданої інструкції.

Концентрацію фібриногену в крові визначали за масою згустка, 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:

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

Статистичну обробку даних виконали за допомогою комп'ютерної програми “MYNOVA”, використовуючи t-тест Стьюдента [10].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В ході нашого дослідження встановлено, що іони шестивалентного хрому у концентраціях 1 та 2,5 мг/л зумовлюють

зниження показника насичення трансферину залізом в 2,7 та 2,4 рази відповідно у порівнянні з контролем, де даний показник становить 52 % (рис. 1).

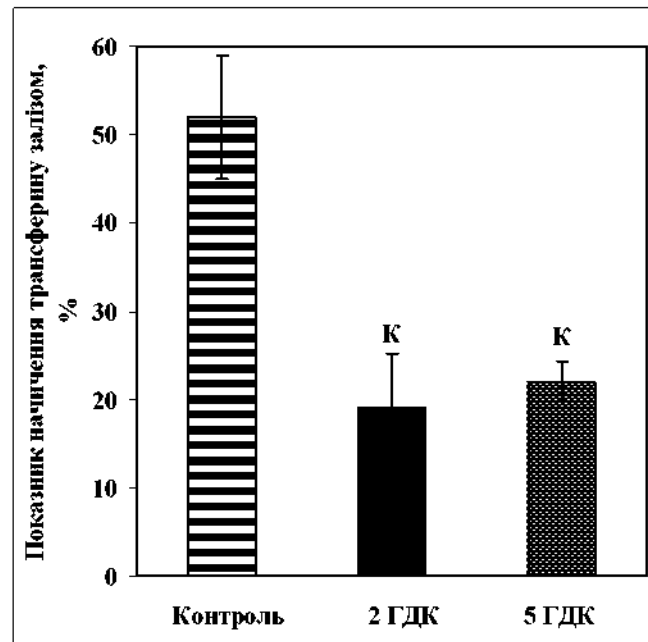


Рис. 1. Показник насичення трансферину залізом периферійної крові *Cyprinus carpio L.* у контролі та за умов дії біхромату калію.

Концентрація Cr^{6+} 1 мг/л (2 ГДК) та 2,5 мг/л (5 ГДК). Дані представлені як середнє \pm його похибка (n=6). Надписи над стовпчиками означають вірогідну відмінність з вказаною групою, $P < 0,005$.

При вивченні активності церулоплазміну встановлений дозозалежний ефект. У контролі активність ферменту становила 4,38 у.о. Після дії 2 та 5 ГДК Cr^{6+} активність мідь-оксидази зменшилась на 1,97 та 2,97 у.о. відповідно від рівня контролю, а 5 ГДК металу інгібували даний фермент на 1 у.о. відносно 2 ГДК (рис. 2).

Літературні дані стосовно впливу іонів тривалентного хрому на білки “гострої фази” риб поодинокі, а шестивалентного – відсутні. Разом з тим, в людей встановлено, що шестивалентний хром в низьких концентраціях (3,3-3,5 мкмоль) спричиняє зниження показника насичення трансферину залізом та активності церулоплазміну [9]. Отримані нами результати в експерименті на коропах свідчать про подібні ефекти шестивалентного хрому на організм риб. Можливо такий ефект зумовлений тим, що трансферин і церулоплазмін можуть зв’язуватись із іонами заліза та міді відповідно, а хром, утворюючи зв’язок з даними білками, блокує їх активні центри. Це дає підстави дані показники вважати біомаркерами токсичності іонів шестивалентного хрому як у людей, так і в риб.

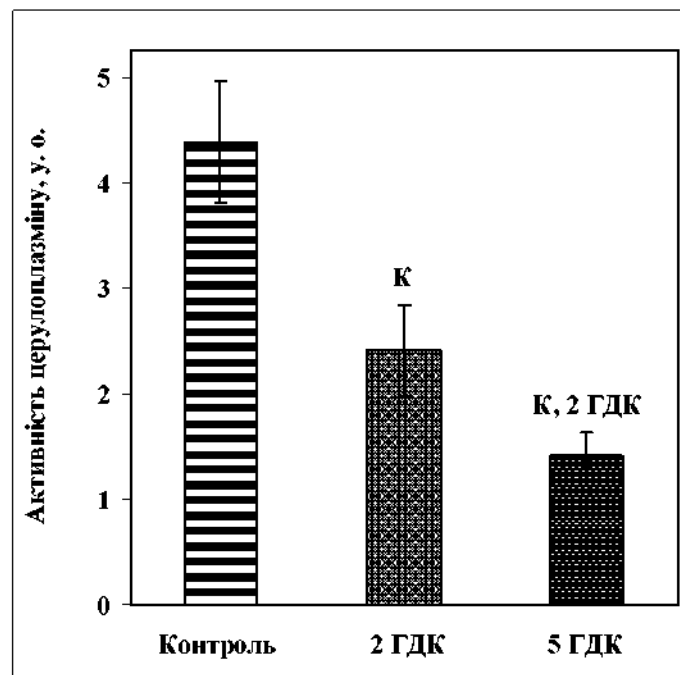


Рис. 2. Активність церулоплазміну периферійної крові *Cyprinus carpio L.* у контролі та за умов дії біхромату калію. Концентрація Cr^{6+} 1 мг/л (2 ГДК) та 2,5 мг/л (5 ГДК). Дані представлені як середнє \pm його похибка ($n = 6$). Надписи над стовпчиками означають вірогідну відмінність з вказаною групою,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

При вивченні концентрації фібриногену та С-реактивного білку в сироватці крові риб в експерименті отримано наступні результати. Концентрації фібриногену та С-реактивного білку в контролі були рівними $2,75 \pm 0,38$ г/л і $1,8 \pm 0,3$ мг/л відповідно. За умов дії іонів шестивалентного хрому в концентраціях 1 та 2,5 мг/л їх вміст незначно відрізнявся від рівня контролю. Дані представлені в таблиці 1.

Таблиця 1. Концентрація фібриногену а С-реактивного білку в сироватці крові *Cyprinus carpio L.* у контролі та за умов дії біхромату калію.

Показник	Контроль	2 ГДК	5 ГДК
Фібриноген, г/л	$2,75 \pm 0,38$	$2,64 \pm 0,27$	$2,02 \pm 0,44$
С-реактивний білок, мг/л	$1,8 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,47$	$1,25 \pm 0,46$

Відомо, що С-реактивний білок доволі чутливий до дії різноманітних чинників. Зокрема, в експериментах на кольоровій форелі встановлене зменшення його концентрації в сироватці крові внаслідок 45 хв дії перманганату калію. Підвищення температури води на 3-6 $^{\circ}\text{C}$ зумовлювало збільшення даного показника [14]. Інтоксикація деякими металами може спричиняти підвищення концентрації С-реактивного білку в сироватці. Так в експерименті на коропях *Catla catla* даний показник збільшився в 2,8 – 3,5 рази [15].

Отримані нами дані з використанням шестивалентного хрому в концентраціях 1,0 та 2,5 мг/л не дозволили встановити чітку закономірність їх впливу. Можливо концентрації іонів хрому (VI), що були вивчені в ході нашого дослідження, не є достатніми для того, щоб індукувати чи пригнітити синтез фібриногену та С-реактивного білка.

Таким чином, білки “гострої фази” коропа по-різному відповідають на дію іонів шестивалентного хрому. Так, активність церулоплазміну та показник насичення трансферину залізом знижуються у відповідь на дію 1,0 та 2,5 мг/л хрому (VI), в той же час концентрації С-реактивного білку та фібриногену незначно коливаються в межах контролю.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бабенко Г.А. Микроэлементы в экспериментальной и клинической медицине. – К., 1965. – 183 с.
2. Давидов О.Н, Темниханов Ю.Д., Куровская Л.Я. Патология крови рыб. – Фирма “ИНКОС”, 2006. – 206 с.
3. Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б. Влияние тяжелых металлов на иммунофизиологический статус рыб // Успехи соврем. биологии. – 2003. – Т. 123, №4. – С. 401-408.
4. Микряков В.Р., Микрякова Л.В., Заботкина Е.А. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. – М.: Наука, 2001. – С. 3-103.
5. Селиверстов В.В. Методические указания по проведению гематологического обследования рыб. – М., 1999. – 38 с.
6. Филенко О.Ф., Михеева И.В. Основы водной токсикологии. – М.: Колос, 2007. – 144 с.
7. Чиркин В.В., Карандашов В.И., Палеве Ф.Н. Иммунореабилитация (патофизиологические и клинические аспекты). – М.: Медицина, 2003. – 400 с.
8. Banha J., Marques L., Oliveira R., Martins M., Paixao E., Pereira D., Malho R., Penque D., Costa L. Ceruloplasmin expression by human peripheral blood lymphocytes: a new link between immunity and iron metabolism // Free Radic. Biol. Med. – 2008. – Vol. 44, № 3. – P. 483-492.
9. Bolonchu W.W., Lukask H.C., Miln D.B., Sider W.A. Chromium supplementation and resistance training: effects on body composition, strength, and trace element status of men // Am. J. Clin. Nutr. – 1996. – Vol. 63, № 6. – P. 954-965.
10. Brooks S. P. J. A simple computer program with statistical test analysis of enzyme kinetics // Bio Techniques. – 1992. – P. 906-911.
11. Dam W., Nussey M., Vuren JHJ., Preez NH. Bioaccumulation of chromium, manganese, nickel and lead in the tissues of the moggel, *Labeo umbratus* (Cyprinidae) // Water SA. – 2000. – Vol. 26, № 2. – P. 269-286.
12. Eisler R. Chromium nazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review // Contam. Nazard Reviews. – 1986. - № 6. – P. 85-109.

13. Gruys E., Toussaint M.J.M., Niewold T.A., Koopmans S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins // J. Zhejiang Univ SCI. – 2005. – Vol. 6, № 11. – P. 1045-1056.
14. Kodama H., Matsuoka Y., Tanaka Y., Liu Y., Iwasaki T., Watarai S. Changes of C-reactive protein levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sera after exposure to antiectoparasitic chemicals used in aquaculture // Fish & Shellfish Immunology. – 2004. – Vol. 16, № 5. – P. 589-597.
15. Paul I., Mandal C., Mandal C. Effect of environmental pollutants on the C-reactive protein of a freshwater major carp, *Catla catla* // Developmental & Comparative Immunology. – 1998. – Vol. 22, № 5-6. – P. 519-532.

С.І. Данылив, М.А. Мазепа

РЕАКЦИЯ БЕЛКОВ “ОСТРОЙ ФАЗЫ” НА ТОКСИЧНОЕ ВЛИЯНИЕ ШЕСТИВАЛЕНТНОГО ХРОМА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ С *CYPRINUS CARPIO L.*

Ключевые слова: белки “острой фазы”, церулоплазмин, трансферин, С-реактивный белок, фибриноген, токсичность, *Cyprinus carpio L.*, хром

Соединения хрома за последние годы занимают одно из ведущих мест среди загрязнителей окружающей среды. У рыб шестивалентный хром имеет способность легко проникать сквозь жаберные мембраны и быстро накапливается в разных тканях. Белки “острой фазы” (трансферин, церулоплазмин, С-реактивный белок, фибриноген) реагируют на нарушение гомеостаза организма. Они могут модифицировать функции клеток иммунной системы - усиливать подвижность лейкоцитов, взаимодействуют с комплементом, принимают участие в лизисе клеток, некоторые из них стимулируют активацию лимфоцитов, усиливают активность природных киллеров. Целью работы было установить изменения этих показателей в крови *Cyprinus carpio L.* в ответ на острое действие повышенных концентраций ионов шестивалентного хрома.

Эксперимент проводили на *Cyprinus carpio L.* с добавлением к воде аквариума бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$), концентрация ионов шестивалентного хрома составляла 1,0 и 2,5 мг/л., время экспозиции – 96 часов. Установлено снижение показателя насыщения трансферина железом в 2,7 и 2,4 раза и активности церулоплазмينا в 1,8 и 3,1 раза соответственно в сравнении с контролем. Вместе с тем, концентрации фибриногена и С-реактивного белка достоверно не изменились. Полученные данные свидетельствуют о том, что белки “острой фазы” карпа по-разному реагируют на действие ионов данного металла, показатели активности церулоплазмينا и трансферина можно рекомендовать биомаркерами токсичности ионов шестивалентного хрома у рыб.

S.I. Danyliv, M.A. Mazepa

THE REACTION OF ACUTE PHASE PROTEIN ON THE TOXIC INFLUENCING OF HEXAVALENT CHROMIUM IN THE EXPERIMENT WITH *CYPRINUS CARPIO L.*

Keywords: acute phase protein, ceruloplasmin, transferrin, C-reactive protein, fibrinogen, toxic, *Cyprinus carpio L.*, chromium

Chromium compounds in the last few years occupy one of leading places among pollutants of environment. In fishes hexavalent chromium has power easily to penetrate through branchial membranes and quickly accumulates in different tissues. The acute

phase proteins (transferrin, ceruloplasmin, the C-reactive protein, and fibrinogen) react on violation of homeostasis of organism. They can modify the functions of the immune system cells – to strengthen mobility of leucocytes, co-operate with complement, part taken in the lyses of cells, some of them stimulate activating of lymphocytes, the activity of natural killers is strengthened. The aim of this work was to set the changes of these indexes in a blood *Cyprinus carpio L.* in reply to sharp action of the promoted concentrations of hexavalent chromium ions.

The experiment was conducted on *Cyprinus carpio L.* with addition to water to the aquarium to potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$), concentration of hexavalent chromium ions was 1,0 and 2,5 mg/l, time of display – 96 hours. The decline of index of transferrin saturation is set in 2,7 and 2,4 times and activity of ceruloplasmin in 1,8 and 3,1 times accordingly in comparison with the control. At the same time, concentrations to the fibrinogen and C-reactive protein for certain did not change. Finding testify to that the acute phase protein of carp variously react on action of the given metal ions, the indexes of activity of ceruloplasmin and transferrin can be recommended by the biomarkers of toxic of hexavalent chromium ions at fishes.