

# ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

УДК 597.554.3:574.64:612.017

## НЕКОТОРЫЕ ИММУНОБИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЗОЛОТОГО КАРАСЯ *CARASSIUS CARASSIUS* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СУБЛЕТАЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИОНОВ ЦИНКА

*Н.И. Силкина,  
Д.В. Микряков,  
В.Р. Микряков*

ФГБУН Институт  
биологии внутренних вод  
им. И.Д. Папанина РАН, 152742,  
Ярославская обл., Некоузский  
р-он, п. Борок, Российская  
Федерация

**П**редставлены результаты изучения некоторых иммунобиохимических показателей золотого карася при хроническом воздействии сублетальных концентраций ионов цинка. В сыворотке крови и печени исследованы антимикробные свойства, доля иммунодефицитных особей, содержание неспецифических иммунных комплексов, уровень общих липидов, содержание продуктов перекисного окисления липидов и антиоксидантная активность. Показана зависимость величин исследуемых показателей от времени пребывания рыб в условиях эксперимента.

**Ключевые слова:** золотой карась, ионы цинка, гуморальный иммунитет, липиды, прооксидантно-антиоксидантная система.

**Введение.** В настоящее время в результате интенсивного антропогенного загрязнения содержание многих тяжелых металлов (ТМ) в воде и гидробионтах повышается, во много раз превышая ПДК [1]. Многие водоемы загрязнены ТМ, которые в отличие от органических загрязнителей не подвергаются биодegradации и очень медленно покидают биологический цикл. ТМ могут находиться в растворимой (или ионной), во взвешенной или коллоидной (органической и неорганической) форме в зависимости от наличия растворенных органических соединений и от рН среды. Ионные формы или их липофильные комплексы обладают наибольшей биологической активностью. ТМ, накапливаясь в грунтах, становятся вторичными источниками загрязнения гидробионтов.

Избыточное поступление высоких концентраций ТМ оказывает токсическое действие на организм рыб [2-5].

Цинк попадает в организм рыб с водой и пищей и считается одним из широко распространенных и опасных токсичных для гидробионтов элементов группы ТМ [6-8]. Обычные фоновые уровни цинка не превышают 0.001-0.02 мг/л. ПДК цинка для рыбохозяйственных водоемов – 0.05 мг/л. [1]. В организме этот элемент участвует в биоэнергетических и окислительно-восстановительных процессах, ферментативных реакциях, синтезе и расщеплении углеводов, жиров и белков и всех видах обмена. Цинк входит в состав генетического аппарата клетки, регулирует перенос генетической информации в ходе репликации ДНК, оказывает

**Силкина Нина Иосифовна (Silkina Nina Iosifovna)**, к.б.н., с.н.с. лаборатории иммунологии Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, 152742, Ярославская обл., Некоузский р-он., п. Борок, sni@ibw.yaroslavl.ru

**Микряков Даниил Вениаминович (Mikryakov Daniil Veniaminovich)**, к.б.н., зав. лабораторией иммунологии Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, 152742, Ярославская обл., Некоузский р-он., п. Борок, daniil@ibw.yaroslavl.ru

**Микряков Вениамин Романович (Mikryakov Veniamin Romanovich)**, проф., д.б.н. гл.н.с. лаборатории иммунологии Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, 152742, Ярославская обл., Некоузский р-он., п. Борок, mvr@ibw.yaroslavl.ru

влияние на рост, развитие и размножение, повышает иммунитет, адаптацию и сопротивляемость организма к негативному воздействию биотических и абиотических факторов [6].

Применяемые в промышленности высокотоксичные соединения цинка (сульфаты, хлориды и оксиды) попадая в водную среду, оказывают токсическое влияние на рыб. Негативное влияние высоких концентраций этого элемента на организм рыб выражается нарушениями синтеза ДНК, белков, металлопротеинов, лактатдегидрогеназы и других ферментов, а также замедлением роста и развития [6-9]. Однако в доступной литературе недостаточно данных об иммунобиохимическом статусе рыб при длительном пребывании в воде, содержащей цинк в низких концентрациях.

*Цель работы* – изучение хронического воздействия цинка в низких концентрациях на показатели врожденного иммунитета и прооксидантно-оксидантный статус золотого карася.

**Материалы и методы исследования.** Работа выполнена на 110 сеголетках золотого карася *Carassius carassius* средней массой 60-67 г и длиной 17-18 см. Рыб содержали в плексигласовых аквариумах объемом 150 л и ежедневно кормили сухим гранулированным кормом. Опытных карасей содержали в растворе сульфата цинка ( $ZnSO_4$ ), а контрольных – в чистой воде. Воду меняли ежедневно, каждый раз добавляя свежий раствор токсиканта, который готовили непосредственно перед добавлением в аквариум. Конечная концентрация по действующему веществу – иону  $Zn^{2+}$  составляла 0,005 мг/л, что соответствовало 1/50 от установленной 96-час  $LC_{50}$ . После 30 дней экспозиции с токсикантом, опытных рыб помещали в чистую воду на 45 сут («отмывка»). Отбор проб осуществляли от 10 особей в контрольной и опытной группе на 1, 7, 14, 30 и 75 сут от начала опыта.

В сыворотке крови определяли бактериостатическую активность (БАСК), долю иммунодефицитных особей (ИМД), содержанию неспецифических иммунных комплексов (ИК); в тканях печени – количество общих липидов (ОЛ), интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровень антиокислительной защиты (АЗ).

БАСК выявляли нефелометрическим методом в модификации В.Р. Микрякова [10]. В качестве тест-микробов использовали суточную культуру *Aeromonas hydrophila*. В зависимости от уровня БАСК отбирали иммунодефицитных рыб (ИМД), сыворотка крови которых не угнетала развитие тест-микробов. ИК изучали методом селективной преципитации 7% полиэтиленгликолем молекулярной массы 6000

спектрофотометрически при длине волны 280 нм по методу Ю.А.Гриневиц и А.Н.Алферова [11]. Для экстракции липидов использовали хлороформ-метаноловую смесь в соотношении 1:2 по методу Фолча [12], количество ОЛ определяли весовым методом после отгонки экстрагирующей смеси [13]. Об уровне ПОЛ судили по накоплению малонового диальдегида (МДА) – одного из конечных продуктов перекисного окисления [14]. Интенсивность процессов АЗ устанавливали интегральным методом В.Л.Семенова и А.М.Ярош [15] по кинетике окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха в присутствии и отсутствии тканевых экстрактов (КОС). Сущность метода заключается в том, что чем выше скорость окисления субстрата в присутствии биологического материала, тем ниже содержание антиоксидантов в тканях. Статистическую обработку результатов исследования проводили по стандартным алгоритмам, реализованным в пакете программ (Statistica) с использованием t-теста ( $p \leq 0.01$ ).

**Результаты и обсуждение.** Анализ результатов свидетельствует, что за период эксперимента зафиксирована 100%-ная выживаемость, поведение рыб не изменилось, патологий внутренних органов не выявлено.

Показатель БАСК, служащий интегрированным выражением противомикробных свойств гуморального звена неспецифического иммунитета (лизоцима, комплемента, пропердина, протеаз, С-реактивного белка, агглютининов, преципитинов и т.д.), у опытных рыб на 7 сут немного повысился, а на 14 и 30 сут снизился по сравнению с контролем на 4.4 и 3.1 раза соответственно (табл.). После пересадки рыб в чистую воду зафиксировано нарастание уровня БАСК до контрольных значений. На 30 сут в опытной группе рыб появилось 20% ИМД особей, но на 75 сут число таких особей снизилось до 10%.

Во все сроки наблюдения уровень ИК печени у опытных карасей превышал контрольные значения, нарастая со временем пребывания в загрязнителе: на 7, 14 и 30 сут – на 26.6%, 43.8%, и 78% соответственно. При пересадке рыб в чистую воду на 75 сут показатель ИК снизился, но оставался выше контроля на 9.7%. ИК – комплексы, состоящие из антиген-антигена и связанных с ними компонентов системы комплемента выполняют важную роль в процессах регуляции иммунных реакций, элиминации ксенобиотиков из организма и поддержании иммунофизиологического гомеостаза. При насыщении организма чужеродными телами, в том числе аутоантигенами, инфекцион-

ными агентами и токсическими соединениями, происходит избыточное образование ИК вследствие снижения клиринговой функции клеток фагоцитарной системы. Повышенный уровень ИК является фактором, вызывающим супрессию механизмов иммунного гомеостаза [16]. Нарастание количества ИК у опытных рыб одна из причин снижения БАСК, а появление ИМД особей свидетельствуют об иммуносупрессивном действии токсиканта на механизмы врожденного гуморального иммунитета [10].

Уровень ОЛ печени у опытных рыб на 14 и 30 сут был выше контрольных показателей, однако после «отмывки» – снизился до нормы. Повышенная концентрация липидов характерна для рыб, обитающих при высокой антропогенной нагрузке [17].

Важным механизмом регуляции метаболических процессов в любом организме – динамическое равновесие окислительно-восстановительных процессов, обеспечиваемое прооксидант-антиоксидантной системой [18-20]. У опытных рыб зафиксировано повышение содержание МДА. Причина интенсификации ПОЛ – увеличение активных форм кислорода (супероксидный и гидроксильный радикалы, синглетный кислород, пероксиды и многие другие соединения) и снижение количества антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза) и низкомолекулярных антиоксидантных соединений (восстановленный глутатион, б-токоферол, фенольная форма коэнзима Q<sub>10</sub>, б-каротин, аскорбиновая кислота и др.). На дефицит антиоксидантов у опытных карасей указывают повышенные показатели КОС. Высокий уровень содержания конечных продуктов ПОЛ и скорость КОС отражают дисбаланс

в прооксидантно-антиоксидантной системе. Изменение соотношения между ПОЛ и активностью процессов АЗ тканей считается одним из чувствительных индикаторов, отражающих влияние неблагоприятных стресс-факторов на метаболические процессы и состояние здоровья рыб. Сдвиг баланса системы ПОЛ ↔ АЗ в организме опытных рыб в сторону интенсификации процессов ПОЛ приводит к окислительному стрессу [21,22]. При оптимальных условиях соотношение этих систем жизнеобеспечения поддерживается на стационарном минимальном уровне [20]. При действии негативных стресс-факторов происходит активация процессов окислительного стресса, которая связана с избыточным накоплением АФК и снижением активности ферментных и неферментных антиоксидантов. Аналогичные нарушения выявлены у гидробионтов в районах с повышенной антропогенной нагрузкой [23-27].

**Заключение.** Хроническое воздействие сублетальных концентраций цинка вызывает супрессию функций гуморального иммунитета, снижение антиоксидантов в организме золотого карася и повышение уровня ИК, ОЛ и продуктов ПОЛ. Помещение опытных рыб в чистую воду для «отмывки» после 30-ти дневной экспозиции в токсиканте привело лишь к частичному восстановлению иммунобиохимического статуса рыб.

Установленные модификации в функционировании иммунобиохимических механизмов гомеостаза опытных рыб следует рассматривать как типичную реакцию рыб на загрязняющие вещества. Выявленные отличия в уровнях исследуемых показателей могут служить основой при разработке биотестов для оценки состояния здоровья рыб и качества воды.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Перечень рыбохозяйственных нормативов: предельно допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. М.: ВНИРО; 1999.
2. Будников К.Г. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем. Соросовский образоват. журн. Биология. 1998; 7: 23 – 29.
3. Первозанников М.А., Богданова Е.А. Тяжелые металлы в пресноводных экосистемах. СПб: Наука; 1999.
4. Bury N.R., Walker P.A., Glover C.N. Nutritive metal uptake in teleost fish. Journal of Experimental Biology. 2003; 206: 11 – 23.
5. Бедрицкая И.Н. Влияние тяжелых металлов на организм рыб, выращиваемых на сбросных водах электростанций. Автореф. дисс. кан. биол. наук. М.; 2010.
6. Ребров В.Г., Громова О.А. Витамины, макро- и микроэлементы. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008.
7. Zaranyika Mark F., Goredema Remembrance. Concentration of Cd, Cu, Ni, Pb, Zn and Mn in bream, Oreochromis macruchir, during the 1996 mass fish deaths in Lake Chivero, Zimbabwe. J. Environ. Sci. And Health. A. 1997; 32 (7): 895 – 1906.
8. Malic D.S., Sastry K.V., Hamilton D.P. Effects of zinc toxicity on biochemical composition of muscle and liver of murre (Channa punctatus). Environ. Int. 1998; 24 (3): 433 – 438.
9. Леус Ю.В., Арсан В.О., Грубинко В.В. Прооксидантно-антиоксидантный статус организма карпа при действии ионов меди, марганца, свинца и цинка. ДАН Украины. 1998; (7): 155 – 159.
10. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН; 1991.
11. Гриневич Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных. Лаб. дело. 1981; (8): 493 – 496.
12. Folch J., Lees M., Stanley G.N. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 1957; 226 (3): 497 – 509.
13. Кейтс. М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир; 19
14. Андреева Л.И., Кожемякин Н.А., Кишкун А.А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой. Лаб. дело. 1988; 11: 41 – 43.
15. Семенов В.Л., Ярош А.М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала. Укр. биохим. журн. 1985; 57(3): 50 – 52.
16. Логинов С.И., Смирнов П.Н., Трунов А.Н. Иммунные комплексы у животных и человека: норма и патология. Новосибирск: Сиб. Отд.-ние. ИЭВС и ДВ РАСХН; 1990.
17. Смирнов Л.П., Богдан В.В. Липиды в физиолого-биохимических адаптациях экотермных организмов к абиотическим и биотическим факторам среды. М.: Наука; 2007.
18. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА; 2008.
19. Fiho W.D. Fish antioxidant defences – A comparative approach. Braz. J. Med. and Biol. Res. 1996; 29 (12): 1735 – 1742.
20. Winston G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. Comp. Biochem. and Physiol. 1991; 100 (1-2): 173 – 176.
21. Moseley R., Hilton J.R. Waddington, R.J., Harding, K.G., Stephens, P. Thomas D.W. Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and

chronic wound environments. Wound Repair Regen. 2004; 12 (4): 419 -429.

22. Экоотоксикологические исследования прибрежной черноморской ихтиофауны в районе Севастополя. Под ред. И.И. Рудневой. М.: ГЕОС; 2016.

23. Микряков В.П., Силкина Н.И., Микряков Д.В. Влияние антропогенного

загрязнения на иммунологические и биохимические механизмы поддержания гомеостаза у рыб Черного моря. Биол. моря. 2011; 37 (2): 142 – 148.

24. Моисеенко Т.И. Водная экотоксикология: Теоретические и прикладные аспекты. М.: Наука; 2009.

25. Силкина Н.И., Микряков Д.В.,

Микряков В.П. Влияние антропогенного загрязнения на окислительные процессы в печени рыб Рыбинского водохранилища. Экология. 2012; (5): 361 – 365.

26. Kuzminova N., Rudneva I., Salekhova L. Salekhova L., Shevchenko N., Oven L. State of Black Scorpion fish (*Scorpaena*

*porcus* L., 1758) inhabited coastal area of Sevastopol region (Black Sea) in 1998–20Turkish J. Fish. Aquat. Sci. 2011; (11): 101 – 111.

27. Rudneva I.I., Kuzminova N.S. Effect of chronic pollution on hepatic antioxidant system of Black Sea fish species. Int. J. Sci. Nature. 2011; 2 (2): 279 – 286.

## REFERENCES:

1. The list of fishery standards: the maximum permissible concentration (MPC) and occupational exposure limit (OEL) of harmful substances for water in water bodies that are of fishery importance. M.: VNIRO; 19 (in Russian).
2. Budnikov G.K. Heavy metals in environmental monitoring of aquatic systems. Soros educational journal Biology. 1998; 7 (5): 23 – (in Russian)
3. Perevoznikov M.A., Bogdanova E.A. Heavy metals in freshwater ecosystems. St. Petersburg: Nauka; 19(in Russian)
4. Bury N.R., Walker P.A., Glover C.N. Nutritive metal uptake in teleost fish. Journal of Experimental Biology. 2003; 206: 11 – 23.
5. Bedrickaja I.N. The influence of heavy metals on the organism of fish grown in waste waters of power plants. Avtoref diss. kan. biol. nauk. M.; 20(in Russian)
6. Rebrov V.G., Gromova O.A. Vitamins, macro – and micronutrients. Moscow: GEOTAR\_Media; 20(in Russian)
7. Zaranyika Mark F., Goredema Remembrance. Concentration of Cd, Cu, Ni, Pb, Zn and Mn in bream, *Oreochromis macruchir*, during the 1996 mass fish deaths in Lake Chivero, Zimbabwe. J. Environ. Sci. And Health. A. 1997; 32 (7): 895 – 1906.
8. Malic D.S., Sastry K.V., Hamilton D.P. Effects of zinc toxicity on biochemical composition of muscle and liver of murre (*Channa punctatus*). Environ. Int. 1998; 24 (3): 433 – 438.
9. Leus Yu.V., Arsan O.M.Y., Grubinko V.V. Prooxidant-antioxidant status of the body of a carp under the action of ions of copper, manganese, lead and zinc. DAN of Ukraine. 1998; (7) :155 – 1(in Russian).
10. Mikryakov V.R. Regularities of Formation of Acquired Immunity in Fishes. Rybinsk: IBIW RAN; 19(in Russian)
11. Grinevich Y.A., Alferov A.N. Determination of immune complexes in the blood of cancer patients. Laboratory Practice. 1981; (8): 493 – 4(in Russian)
12. Folch J., Lees M., Stanley G.N. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues. J. Biol. Chem. 1957; 226 (3): 497 – 509.
13. Cates M. Techniques of Lipidology. Amsterdam: North\_Holland Publishing Co.; 1972.
14. Andreeva L.I., Kozhemyakin N.A., Kishkun A.A. Modification of methods for determining lipid peroxides in the thiobarbituric acid test. Laboratory Practice. 1988; (11): 41 – (in Russian)
15. Semenov V.L., Yarosh A.M. Method for determination of antioxidant activity of biological material. Ukr. biokhim. zhurn. 1985; 57 (3): 50 – (in Russian)
16. Loginov S.I., Smirnov P.N., Trunov A.N. Immune Complexes in Animals and Humans: the Norm and Pathology. Novosibirsk: RASKhN, Sib. otd., Institute of Experimentally Veterinary Medicine of Siberia and Far East; 19(in Russian)
17. Smirnov L.P., Bogdan V.V. Lipids in Physiological-Biochemical Adaptations of Ectothermal Organisms to Abiotic and Biotic Environmental Factors, Moscow: Nauka; 20(in Russian)
18. Menshikova E.B., Zenkov N.K., Lankin, V.Z., Bondar I.A., Trufakin V.A. Oxidative Stress: Pathological Conditions and Diseases. Novosibirsk: ARTA; 20(in Russian)
19. Fiho W.D. Fish antioxidant defences – A comparative approach. Braz. J. Med. and Biol. Res. 1996; 29 (12): 1735 – 1742.
20. Winston G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. Comp. Biochem. and Physiol. 1991; 100 (1–2): 173 – 176.
21. Moseley R., Hilton J.R. Waddington, R.J., Harding, K.G., Stephens, P. Thomas D.W. Comparison of oxidative stress biomarker profiles be tween acute and chronic wound environments. Wound Repair Regen. 2004; 12 (4): 419 – 429.
22. Ecotoxicological studies of the coastal Black Sea ichthyofauna in the area of Sevastopol. Pod red. I.I. Rudnevoy. M.: GEOS; 20(in Russian)
23. Mikryakov V.R., Silkina N.I., Mikryakov D.V. Effect of Anthropogenic Pollution on the Immunological and Biochemical Mechanisms of Maintaining Homeostasis in Fish of the Black Sea. Russian Journal of Marine Biology. 2011; 37 (2): 151-157.
24. Moiseenko T.I. Aquatic Ecotoxicology: Theoretical and Applied Aspects. Moscow: Nauka; 20(in Russian)
25. Silkina N.I., Mikryakov D.V., Mikryakov V.R. Effect of Anthropogenic Pollution on Oxidative Processes in the Liver of Fish from the Rybinsk Reservoir. Russian Journal of Ecology. 2012; ( 5): 361 – 3(in Russian)
26. Kuzminova N., Rudneva I., Salekhova L. Salekhova L., Shevchenko N., Oven L. State of Black Scorpion fish (*Scorpaena porcus* L., 1758) inhabited coastal area of Sevastopol region (Black Sea) in 1998–20Turkish J. Fish. Aquat. Sci. 2011; (11): 101 – 111.
27. Rudneva I.I., Kuzminova N.S. Effect of chronic pollution on hepatic antioxidant system of Black Sea fish species. Int. J. Sci. Nature. 2011; 2 (2): 279 – 286.

N.I. Silkina, D.V. Mikryakov, V.R. Mikryakov

## SOME IMMUNOBIOCHEMICAL INDICES IN CARASSIUS CARASSIUS EXPOSED TO SUBLETHAL CONCENTRATIONS OF ZINC IONS

I.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences. 152742 Settlement Borok, Yaroslavl region, Rusaian Federation

Investigation results are reported on immunobiochemical indices in carassius carassius at a chronic exposure to sub-lethal Zinc ions concentrations. In blood serum and liver, the following characteristics were investigated: antimicrobial properties, proportion of immune-deficient animals, content of non specific immune complexes, common lipids level, content of lipids peroxidation products and antioxidant activity. The relation between magnitudes of indices under investigation in fishes and the duration of their presence under experimental conditions is shown.

**Keywords:** *carassius carassius*, *Zinc ions*, *humoral immunity*, *lipids*, *pro-oxidant and antioxidant system*.

Материал поступил в редакцию 14.04.2017 г.

