

УРОВЕНЬ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ПЕЧЕНИ И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ КАРПОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭКСТРАКТА ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ*О.В. Дерень, И.Ф. Ривис*

Введение разных доз спиртовой настойки эхинацеи пурпурной наряду с крахмальным клейстером, в основном, увеличивается содержание полиненасыщенных жирных кислот. В скелетных мышцах увеличивается концентрация насыщенных жирных кислот. Более значительно увеличивается содержание высших жирных кислот общих липидов в печени, а также скелетных мышцах карпов которым *per os* вводили 0,5 мл спиртовой настойки эхинацеи пурпурной на килограмм живой массы.

HAIN FATTY ACIDS CONCENTRATION IN THE CARPS LIVER AND CARCASS MUSCLE UNDER INFLUENCING OF EXTRACT OF ECHINACEA PURPUREA*O. Deren, Y. Rivis*

In the carps liver, whom near starch paste in addition *per os* brought different doses alcoholic extract of echinacea purpurea at main increase concentration of polyunsaturated fatty acid n-3 and n-6 family. Increase concentration saturated, mono unsaturated fatty acid n-7 and n-9 family and polyunsaturated fatty acid n-3 and n-6 family in the carcass muscle. Concentration higher fatty acids of total lipids in the carps liver and carcass muscle was the most higher at carps, whom brought *per os* 0.5 ml. alcoholic extract of echinacea purpurea at kg living masses.

УДК 591.11.1+639.215.2+546.817

РЕАКЦІЯ ЛЕЙКОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ КОРОПА НА НАДЛИШКОВІ КОНЦЕНТРАЦІЇ СВИНЦЮ**С.І. Данилів, М.А. Мазепа**

Прикарпатський національний університет ім. В. Стефаника

Перебування коропа у воді з підвищеними концентраціями свинцю (0,2 та 0,5 мг/л) зменшувало загальну кількість лейкоцитів у крові в 1,5 та 1,6 рази порівняно з контролем. Обидві концентрації токсиканта спричиняли зміни у лейкоцитарній формулі: зниження кількості зрілих форм нейтрофілів, базофілів та моноцитів, підвищення вмісту молодих клітин, зокрема лімфобластів, промієлоцитів, мієлоцитів та метамієлоцитів.

Важкі метали потрапляють у водойми як з природних джерел (вимивання гірських порід, ерозія поверхневих ґрунтів, підземні води), так і зі стічними водами промислових та сільськогосподарських підприємств і атмосферними опадами [1]. Риби є найбільшою групою хребетних, які займають більшість територій у водних екосистемах. Іони металів проникають у їхній організм через зябра та стінки кишечника [2], утворюючи в живих тканинах стійкі зв'язки із сірковмісними лігандами, джерелами яких можуть бути білки та низькомолекулярні тіоли [3].

Літературні дані стосовно впливів на лейкоцити периферичної крові коропа порушують питання впливу світла [4], бактеріальної інфекції [5, 6], амонію [7]. Про вплив свинцю на клітини крові відомостей мало.

Встановлено, що за умов перебування риб у воді з підвищеними концентраціями свинцю відбувається зміна загальної кількості лейкоцитів, відсоткового вмісту нейтрофілів та лімфоцитів [8]. Ці показники зазнають змін в організмі риб навіть після виходу із забрудненого свинцем середовища [9]. На думку деяких учених, лімфоцити периферичної крові

риб можуть слугувати індикатором імунотоксичності важких металів [7].

Метою нашої роботи було встановити зміни клітинних показників природної резистентності коропа у відповідь на дію підвищених концентрацій іонів свинцю.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Кров для досліджень забирали з хвостової вени коропа. Мазки висушували, фіксували та зафарбовували еозин-метиленовим за Май-Грюнвальдом з наступним дофарбовуванням азур-еозином за Романовським [10]. Усього на мазку підраховували 200 лейкоцитів, які диференціювали залежно від розмірів цитоплазми та ядра, кольором та інтенсивністю забарвлення і обчислювали відсотковий вміст певного класу клітин.

Фагоцитарну активність нейтрофілів оцінювали двома методами: за допомогою НСТ-тесту [11] та оцінки фагоцитозу нейтрофілами дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*) спектрофотометрією [12]. Гранулоцити виділяли центрифугуванням плазми крові коропа на градієнті густини Ficol-PAQ (1,077) та доводили їх концентрацію у 0,85%-му розчині NaCl до $2 \cdot 10^6$ /мл. Для дослідження використовували дріжджі. Співвідношення нейтрофіл: до дріжджової клітини становило 1:40 [12].

У 6 пробірок вносили по 100 мкл суспензії гранулоцитів та інкубували 1 год для фіксації клітин на стінках. Потім видаляли клітини, що не прилипли, та підраховували кількість клітин у моношарі. Після цього у 3 пробірки вносили по 100 мкл ізотонічного розчину NaCl (НСТ спонтанний), в інші 3 — по 100 мкл розчину дріжджів (НСТ індукований), також у всі пробірки додавали по 100 мкл 0,5% розчину НСТ та інкубували 30 хв. Далі вимірювали оптичну густина на "Specord M 400" при 540 нм. Розраховували середнє значення з перших 3-х і других 3-х пробірок. Перерахунок проводили на 100 тис. клітин, що прилипли. Також визначали коефіцієнт стимуляції — співвідношення НСТ інд. та НСТ сп. [11].

Для постановки тесту на фагоцитоз до суспензії клітин (250 мкл) додавали розчин дріжджів (500 мкл), який інкубували 1 год додавали 1 мл розчину Хенкса

і нашаровували всю суміш на 1 мл Ficol-PAQ (1,077), центрифугували 5 хв при 850 g. Лейкоцити двічі відмивали розчином Хенкса. Ресуспендували в розчині трипсин-ЕДТА (5 г/л трипсину та 2 г/л ЕДТА). Інкубували суміш впродовж ночі за 37°C. Оптичну густина вимірювали на "Specord M 400" при 550 нм [12].

Статистичну обробку даних виконали за допомогою комп'ютерної програми "MYNOVA". Дані подано як середні із середньою похибкою. Для знаходження вірогідної відмінності між досліджуваними групами використовували *t*-тест Стьюдента [13].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У відповідь на дію обох доз токсиканта (0,2 та 0,5 мг/л) в периферичній крові коропа загальна кількість лейкоцитів зменшувалась порівняно з контролем у 1,5 та 1,6 раза відповідно і становила 661,40 та 622,26 тис./мм³ (рис. 1).

Отримане нами зниження загальної кількості лейкоцитів периферичної крові коропа також було показане іншими дослідниками при витримуванні цього виду в умовах вищих концентрацій іонів

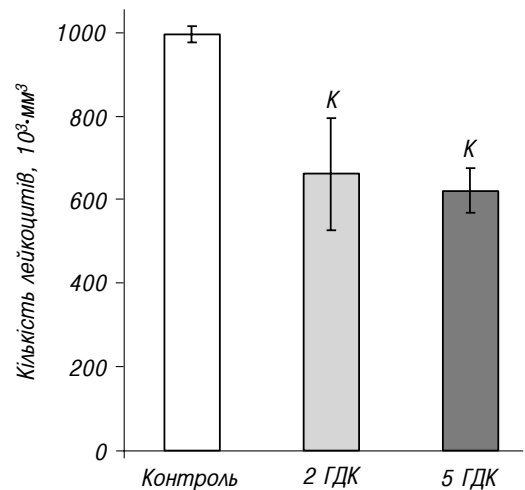


Рис. 1. Кількість лейкоцитів у периферичній крові *Sardinus carpio* L. у контролі та за умов дії ацетату свинцю. Концентрація Pb^{2+} 0,2 мг/л (2 ГДК) та 0,5 мг/л (5 ГДК). Дані представлені як середнє \pm його похибка ($n=6$). Надписи над стовпчиками означають вірогідну відмінність від вказаної групи ($P < 0,005$)

свинцю (10 мг/л) протягом лише 3 год. Цей показник був значно нижчим від контролю через 48 год після переходу до стандартних умов.

Під впливом досліджуваних нами концентрацій іонів свинцю відбувся перерозподіл лейкоцитарної формули. Після перебування риб у воді з іонами свинцю в концентрації 0,2 мг/л у периферичній крові спостерігався вищий вміст лімфоцитів на 20,5% та еозинофілів на 2,4%, а при концентрації іонів металу 0,5 мг/л — лімфобластів на 6% та промієлоцитів на 3,6% порівняно з контролем. Обидві дози токсиканта у водному середовищі зумовлювали зменшення кількості зрілих форм — нейтрофілів (паличкоядерних та сегментоядерних), базофілів та моноцитів, а також значне зростання вмісту молодих форм — мієлоцитів та метамієлоцитів порівняно з контролем, де їх вміст становив 37; 13,5; 23,25; 7,86; 1,33% відповідно (рис. 2).

Отримані зміни у лейкоцитарній формулі периферичної крові демонструють

зменшення кількості зрілих клітин (нейтрофілів, моноцитів, базофілів) і домінування у кров'яному руслі молодих форм клітин (лімфобластів, промієлоцитів, мієлоцитів, метамієлоцитів). Аналогічні результати були отримані при вивченні впливу сублетальних концентрацій амонію на райдужну форель (*Oncorhynchus mykiss*) [7].

Під час експерименту вивчали також і функціональну активність лейкоцитів периферичної крові коропа. Результати НСТ-тесту були такими. За умов впливу 0,5 мг/л іонів свинцю показники НСТ спонтанний та індукований були в 3,8 та 3,3 раза нижчі, ніж при дії 0,2 мг/л, і становили 4,79 та 9,58 у.о. відповідно. Коефіцієнт стимуляції незначно коливався у межах контролю та був рівним 1,79–2,50.

Фагоцитарна активність нейтрофілів за результатами тесту на фагоцитоз у контролі становила 1,225 O.D. 550 nm. Внаслідок перебування риб у середовищі з обома концентраціями токсиканта цей

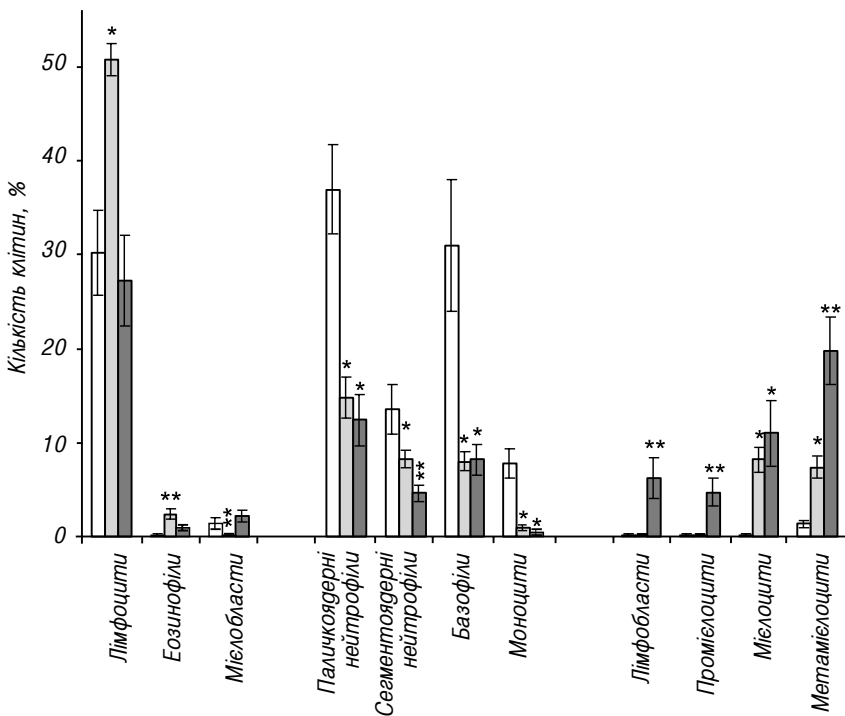


Рис. 2. Розподіл лейкоцитарної формули крові *Cyprinus carpio* L. у контролі та за умов дії ацетату свинцю. Концентрація Pb^{2+} 0,2 мг/л (2 ГДК) та 0,5 мг/л (5 ГДК). Дані представлені як середнє \pm його похибка ($n=6$). *Вірогідно відмінне від контролю, ($P<0,005$). □ — контроль; ■ — 2 ГДК; ■ — 5 ГДК

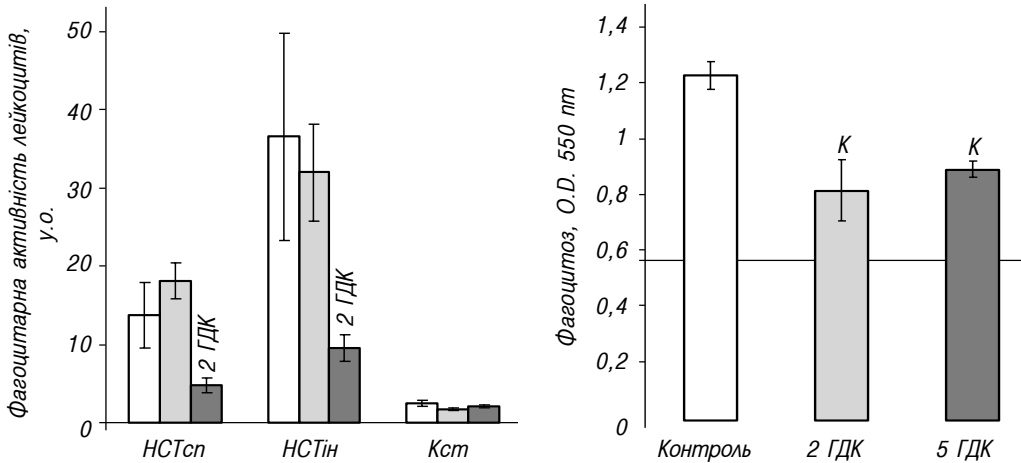


Рис. 3. Фагоцитарна активність нейтрофілів периферичної крові *Cyprinus carpio* L. у контролі та за умов дії ацетату свинцю. Концентрація Pb^{2+} 0,2 мг/л (2 ГДК) та 0,5 мг/л (5 ГДК). Дані представлені як середнє \pm його похибка ($n=6$). Надписи над стовпчиками означають вірогідну відмінність з вказаною групою ($P < 0,005$). □ — контроль; □ — 2 ГДК; ■ — 5 ГДК

показник був нижчим у 1,5 та 1,4 рази порівняно з контролем (рис. 3).

З літературних джерел відомо, що іони свинцю можуть змінювати функціональну активність лейкоцитів [14], оскільки за стресових умов відбувається пригнічення практично всіх неспецифічних імунних функцій. Відомо, що кортизол, який секретується у відповідь на стрес, скорочує тривалість життя лімфоцитів та знижує їх активність, запускаючи апоптотичні процеси у них та пригнічуючи їх проліферацію [9].

З отриманих нами результатів видно, що свинець, навіть при низьких концентраціях, знижує фагоцитарну активність нейтрофілів периферичної крові. Є дані літератури про те, що у відповідь на дію інших токсикантів, зокрема глюкану, також відбувається зменшення цього показника на 50% у райдужної форелі та на 35% у коропів [9]. Однак при годівлі риб

кормом, збагаченим імуностимуляторами, фагоцитарна активність нейтрофілів значно зростала [6].

ВИСНОВКИ

За умов 96-годинного перебування у воді з концентраціями іонів свинцю 0,2 та 0,5 мг/л відбувається зниження загальної кількості лейкоцитів периферичної крові коропа.

У лейкоцитарній формулі крові коропа збільшується відсотковий вміст бластних форм лейкоцитів (лімфобластів, промієлоцитів, мієлоцитів, метамієлоцитів). За умов дії підвищених концентрацій іонів свинцю спостерігалось зниження фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові. Кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу та тести на фагоцитоз можна використовувати як біомаркери токсичності надлишкових концентрацій іонів свинцю.

ЛІТЕРАТУРА

1. Трахтенберг И.М., Шестопалов В.М., Набока М.В., Бобылева О.А. Свинец и другие тяжелые металлы во внешней среде после Чернобыльской катастрофы (к экологической ситуации в Украине) // Междунар. мед. журн. — 1998. — № 3. — С. 94–98.
2. Филленко О.Ф., Михеева И.В. Основы водной токсикологии. — М.: Колос, 2007. — 144 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. Ручин А.Б. Влияние света на лейкоцитарную формулу крови карпа *Cyprinus carpio* L. // Известия РАН. Сер. биол. — 2006. — № 5. — С. 634–637.

5. *Stosik M., Deptula W., Travníček M.* Resistance in carps (*Cyprinus carpio* L.) affected by a natural bacterial infection // *Vet. Med.-Czech.* — 2001. — Vol. 46, № 1. — P. 6–11.
6. *Kolman H., Siwicki A.K., Kolman R.* Influence of O-antigen *Aeromonas salmonicida* on non-specific and specific immune responses in siberian sturgeon, *Acipenser baeri* Brandt // *Arch. Ryb. Pol.* — 1999. — Vol. 7, №1. — P. 93–102.
7. *Vosyliene M.Z., Kazlauskienė N.* Comparative studies of sublethal effects of ammonia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stage of its development // *Acta Zool, Lituan.* — 2004. — Vol. 14, № 1. — P. 13–18.
8. *Witeska M., Jezierska B.* The effects of cadmium and lead on selected blood parameter of common carp // *Arch. Ryb. Pol.* — 1994. — Vol. 2. — P. 123–132.
9. *Witeska M.* Stress in fish — hematological and immunological effects of heavy metals // *Electr. J. Ichthyol.* — 2005. — Vol. 3, № 1. — P. 35–41.
10. *Иванова Н.Т.* Атлас крови рыб. — Москва, 1983. — 79 с.
11. *Сизякина Л.П., Андреева И.И.* Справочник по клинической иммунологии / Серия “Большой вопрос”. — Ростов-на-Дону: Феникс, 2005. — 448 с.
12. *Yin G., Jeney G., Racz T., Xu P., Jun X., Jeney Z.* Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus* // *Aquaculture.* — 2006. — Vol. 253. — P. 39–47.
13. *Brooks S.P.J.* A simple computer program with statistical test analysis of enzyme kinetics // *Bio Techniques.* — 1992. — P. 906–911.
14. *Jung D., Bolm-Audorff U., Faldum A., Hengstler J.G.* et al. Immunotoxicity of co-exposure to heavy metals: *in vitro* studies and results from occupational exposure to cadmium, cobalt and lead // *EXCLI Journ.* — 2003. — Vol. 2. — P. 1611–2156.
15. *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.

РЕАКЦІЯ ЛЕЙКОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ КАРПА НА ИЗБЫТОЧНЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СВИНЦА

С.И. Даныливі, М.А. Мазепа

Пребывание карпа в воде с повышенными концентрациями свинца (0,2 и 0,5 мг/л) уменьшало общее количество лейкоцитов в крови. Обе концентрации токсиканта привели к изменениям в лейкоцитарной формуле: снижению количества зрелых форм нейтрофилов, базофилов и моноцитов и повышению содержания молодых клеток, в частности лимфобластов, промиелоцитов, миелоцитов и метамиелоцитов.

A REACTION OF PERIPHERAL BLOOD LEUCOCYTES OF CARP ON HIGH CONCENTRATIONS OF LEAD

S. Danyliv, M. Mazepa

As a result of stay of carp in water with the promoted concentrations of lead (0,2 and 0,5 mg/l) the common amount of leucocytes in blood decrease in 1,5 and 1,6 times in comparing to the control. Both concentrations of toxicant drew changes in a percentage of blood leucocytes: decline of number of mature forms— neutrophils, basophils and monocutes, increase of maintenance of young cells, in particular lymphoblasts, promyelocytes, myelocytes and metamyelocytes. Subject to the condition presence in the environment of lead ions in concentration 0,2 and 0,5 mg/l phagocytic activity of neutrophils decrease in 1,5 and 1,4 times in comparing to the control.