

УДК 619:611.018.54:639.215.2:615

І. М. Курбатова

БІЛКОВИЙ СПЕКТР ПЛАЗМИ КРОВІ КОРОПА ЗА ДІЇ ХЛОРТЕТРАЦИКЛІНУ

Наведено результати досліджень впливу хлортетрацикліну на фракційний склад білків плазми крові коропа. Показано, що хлортетрациклін у концентрації 1,10 мг/дм³ не впливав на склад білків, у концентрації 3,15 і 6,30 мг/дм³ знижував вміст білків з молекулярною масою 340—450 кДа і вище та сприяв появі фракцій з молекулярною масою 140—200 і 70—90 кДа.

Ключові слова: хлортетрациклін, короп, плазма крові, білки.

В останні роки значно зріс антропогенний тиск на водні екосистеми, зокрема за рахунок стічних вод, що сприяє потраплянню та накопиченню у природних та штучних водоймах значної кількості ксенобіотиків [1, 3, 4, 7, 13]. Особливу небезпеку для гідробіонтів становлять стічні води тваринницьких підприємств, які і після біологічного очищення містять стероїдні гормони та продукти їх метаболізму, залишки лікарських препаратів — антибіотиків, сульфаніламідів, антигельмінтиків та інших токсичних сполук [1]. У воді очисних споруд і річок виявлено близько 70 різних сполук, зокрема естрогенів та їх кон'югатів [12, 13]. Негативний вплив ксенобіотиків проявляється у гальмуванні розвитку ікри та ембріонів риби [3, 4], порушенні функціонального стану органів і тканин, стимуляції процесів антиоксидантного захисту, змінах активності ферментів і енергетики клітини [10] та фракційного складу білків крові [8].

Одним із токсикантів, виявлених у значній кількості у стічних водах тваринницьких підприємств та у воді ставків, є хлортетрациклін [1]. Ця синтетична сполука належить до групи тетрацикліну і практично не розкладається у навколишньому середовищі. Дія хлортетрацикліну на організм пов'язана із гальмуванням біосинтезу білка шляхом блокування фермента РНК-полімерази та зв'язуванням з матричною ДНК на рибосомах [9]. Ймовірно, накопичення у ставках хлортетрацикліну як найбільш вживаного у тваринництві антибіотика, окрім впливу на розвиток риби на різних стадіях онтогенезу, буде змінювати і біосинтез білків у печінці і м'язах, а також фракційний склад білків плазми крові.

Мета досліджень — встановити вплив хлортетрацикліну у різних концентраціях на загальний вміст та фракційний склад білків плазми крові коропа (*Cyprinus carpio* L.).

© І. М. Курбатова, 2016

Матеріал і методика досліджень. В експериментах використовували коропа (*Cyprinus carpio* L.) середньою масою тіла 450—500 г, якого утримували в акваріумах об'ємом 40 дм³ по дві особини. Всього у досліді використано 16 особин (по чотири у кожній групі). Перед посадкою риб у воду додавали хлортетрациклін (хлортетрацикліну гідрохлорид фірми Sigma Aldrich) до концентрації 1,10 мг/дм³ (перша дослідна група), 3,15 мг/дм³ (друга) і 6,30 мг/дм³ (третья дослідна група). У воду акваріума, в якому утримували риб контрольної групи, антибіотик не вносили. У дослідях використовували відстояну водопровідну воду, яку аерували та підтримували її температуру в межах 18—20°C, рН — 7,6—7,8.

Експеримент тривав три доби, під час досліджень риб не годували. Після експозиції у риб відбирали кров, отримували плазму та використовували її для встановлення загального вмісту та фракційного складу білків. Для цього застосовували систему гель-електрофорезу з градієнтом концентрації поліакриламідного геля (ПААГ) 7—18% з додаванням додецилсульфата натрія [14]. Одержані гелі фіксували розчином метанол : формальдегід : дистильована вода у співвідношенні 6 : 1 : 7.

Білкові зони ідентифікували з використанням 0,1%-ного розчину Кумасі G-250 (Serva, Швеція), а молекулярну масу білків встановлювали за стандартними маркерами від 25 до 450 кДа (Thermo Bioscience, Англія).

Кількісну оцінку білкових зон електрофореграм здійснювали шляхом використання гелі-сканера Hewlett-Packard HPS-5500 C, з наступним графічним реконструюванням та обчисленням за відносними одиницями або площею піків спеціальною комп'ютерною програмою Densito Analyse [11]. Загальну кількість білка плазми крові визначали загальноприйнятим методом [2]. Результати досліджень оброблено статистично з використанням критерія Стьюдента та спеціальної програми Microsoft Excel [5].

Результати досліджень та їх обговорення

Хлортетрациклін у концентрації 1,10, 3,15 і 6,30 мг/дм³ та експозиції три доби не впливав на загальний вміст білків у плазмі крові риб (табл. 1). Цей показник був у межах значень, які відповідали оптимальному вмісту білків у плазмі крові коропових риб [6].

Одержані результати вказують на те, що, незважаючи на здатність хлортетрацикліну пригнічувати синтез білка бактеріальних клітин за незначної концентрації у воді і нетривалій експозиції, його вплив на цей процес у тка-

1. Вміст білків у плазмі крові риб за дії хлортетрацикліну ($M \pm m, n = 4$)

Концентрація хлортетрацикліну, мг/дм ³	Вміст білка
Контроль	40,25 ± 3,5
1,10	42,50 ± 3,0
3,15	48,00 ± 4,1
6,30	43,00 ± 2,7

2. Фракційний склад білків плазми крові коропа за дії хлортетрацикліну ($M \pm m, n = 4$)

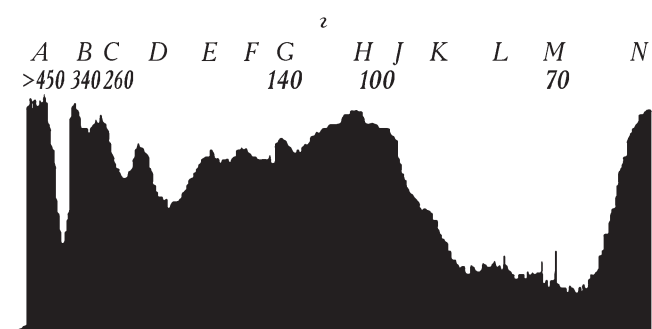
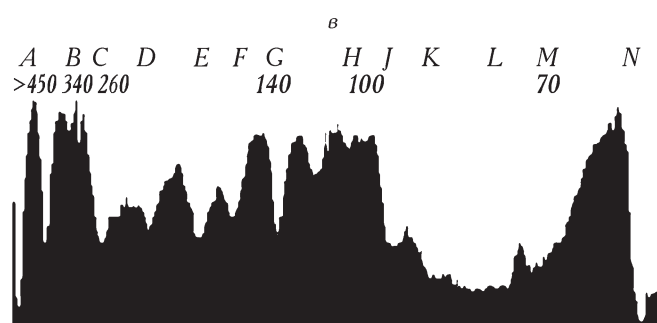
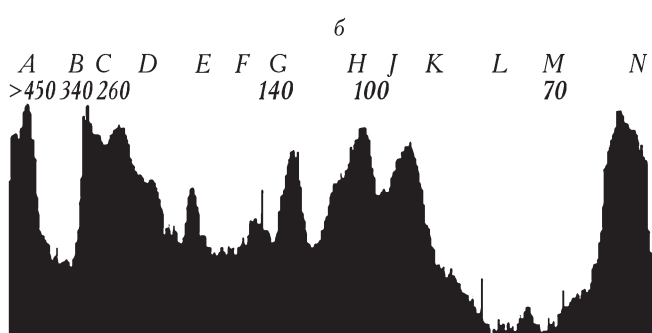
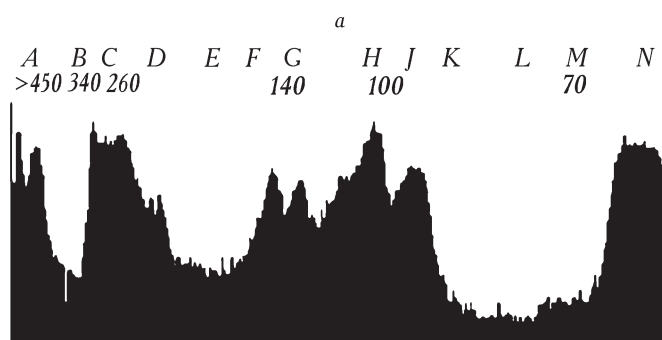
Зона розподілу фракцій білків	Молекулярна маса стандарту, кДа	Концентрація хлортетрацикліну, мг/дм ³			
		контроль	1,10	3,15	6,30
A	> 450	3,31 ± 0,43	4,01 ± 0,30	1,75 ± 0,39*	2,01 ± 0,33*
B	340	2,64 ± 0,43	3,29 ± 0,40	1,46 ± 0,33*	1,47 ± 0,20*
C	260	4,27 ± 0,48	4,82 ± 0,50	2,74 ± 0,37	3,22 ± 0,65
D	—	1,63 ± 0,23	1,64 ± 0,20	0,93 ± 0,22	1,39 ± 0,59
E	—	×	×	0,99 ± 0,31	1,01 ± 0,33
F	—	×	×	1,13 ± 0,34	0,98 ± 0,44
G	140	0,82 ± 0,05	1,38 ± 0,10*	1,38 ± 0,60	1,50 ± 0,22
H	100	1,36 ± 0,09	1,49 ± 0,10	1,23 ± 0,53	1,14 ± 0,11
J	—	2,04 ± 0,90	2,21 ± 0,70	2,65 ± 1,25	1,81 ± 1,13
K	—	1,94 ± 1,01	3,86 ± 1,60	1,19 ± 1,16	1,57 ± 1,06
L	—	×	×	2,60 ± 1,35	2,70 ± 1,28
M	70	6,16 ± 1,52	4,75 ± 0,60	3,77 ± 1,13	5,23 ± 0,77
N	—	3,3 ± 0,20	3,24 ± 0,20	1,81 ± 0,19*	2,39 ± 0,31
O	50	1,46 ± 0,51	1,46 ± 0,40	1,50 ± 0,26	1,70 ± 0,20
P	—	×	×	1,79 ± 0,44	2,18 ± 0,29
Q	35	0,66 ± 0,04	0,56 ± 0,10	0,43 ± 0,18	0,48 ± 0,29
R	25	6,91 ± 0,95	6,26 ± 0,60	5,98 ± 1,46	7,70 ± 0,78

* Різниця ($p < 0,05$) порівняно з контролем достовірна; «—» — стандарту немає; «×» — фракція не виявлена.

нинах риб практично не проявляється. У той же час хлортетрациклін значно змінював фракційний склад білків плазми крові, особливо за концентрації 3,15 і 6,30 мг/дм³.

Аналіз електрофореграм плазми крові риби контрольної групи показав, що найбільшу частку становлять білки, які знаходяться у зонах A, B, C, M і R, що відповідають молекулярним масам 260—450 кДа і більше, і 70 і 25 кДа (рисунки, табл. 2).

Слід відмітити, що білки, розміщені у цих зонах, як правило, належать до різних фракцій глобулінів і альбумінів, а також до низькомолекулярної фракції, яка представлена переважно преальбумінами. Плазма крові коропів контрольної групи містила значно менше білків інших фракцій, зокрема розміщених в зонах D, G, H, J, K, O, P та Q, де знаходяться білки фракцій трансферинів, церулоплазміну, гаптоглобіну та інших груп преальбумінів. Тобто, основними у плазмі крові коропа є білки фракцій альбумінів та гло-



Електрофореграма білків плазми крові коропа за дії хлортетрацикліну: *a* — контроль; *б* — 1,10 мг/дм³; *в* — 3,15 мг/дм³; *г* — 6,30 мг/дм³.

булінів, головна роль яких полягає у забезпеченні транспортних функцій крові і захисту організму від несприятливих чинників водного середовища.

Експозиція риб у воді з концентрацією хлортетрацикліну 1,10 мг/дм³ протягом трьох діб практично не впливала на фракційний склад білків плазми крові (див. табл. 2). Винятком виявились білки фракції *G* з молекулярною масою 140 кДа, кількість яких зросла в 1,7 разу порівняно з контролем. Незначні зміни фракційного складу у особин першої дослідної групи обумовлені насамперед незначною концентрацією діючої речовини і її інактивацією мікроорганізмами води. Не можна також виключати і незначну тривалість експозиції та активацію захисних систем, зокрема цитохромів P₄₅₀ і b₅, до дії даного ксенобіотика [10].

За вищої концентрації хлортетрацикліну (3,15 мг/дм³) фракційний склад білків плазми крові коропа змінювався значно сильніше (див. табл. 2). Так, плазма крові особин

другої дослідної групи містила на 57% менше білків з молекулярною масою 450 кДа і вище (зона А) і на 56% — білків з молекулярною масою 340 кДа (зона В) порівняно з коропами першої. Оскільки ці фракції у тварин містять крім α_2 -макроглобуліну також і ІgМ та γ -глобуліни, ймовірно вища концентрація хлортетрацикліну у воді знижує імунний захист риб. Вміст білків деяких низькомолекулярних фракцій був на 46% нижчим, зокрема розміщених у зоні N. У цій групі виявлено низку додаткових білкових фракцій, розміщених у зонах E, F і L з молекулярною масою 140—200 і 70—90 кДа, а також фракцію з молекулярною масою від 35 до 50 кДа (зона P) (див. табл. 2).

Отримані результати свідчать про суттєвий вплив цієї концентрації хлортетрацикліну на фракційний склад, а також, ймовірно, на електрофоретичну рухливість окремих високо- та низькомолекулярних фракцій, що може бути пов'язане зі зміною заряду білкової молекули $H + Cl^-$, які входять до складу дослідженого ксенобіотика. Це підтверджується фракційним складом білків плазми крові особин третьої дослідної групи, яких витримували за концентрації хлортетрацикліну 6,30 мг/дм³ (див. табл. 2).

У цій групі вміст білків зони А з молекулярною масою понад 450 кДа знизився на 50%, а зони В з молекулярною масою 340 кДа — на 56% порівняно з першою, що може бути пов'язано із впливом ксенобіотиків на фактори імунного захисту. Також виявлено низку додаткових фракцій, розміщених у зонах E, F, L і P, які мали різну молекулярну масу. Не виключено, що хлортетрациклін як сильнодіючий антибіотик у високих концентраціях впливає на білоксинтезуючу функцію печінки, змінюючи фракційний склад білків плазми крові.

Таким чином, у невеликих концентраціях та при нетривалій експозиції хлортетрациклін не впливає на фракційний склад білків плазми крові коропів, а у значних — змінює вміст білків як з високою, так і з низькою молекулярною масою.

Висновки

Встановлено, що дорослі коропи здатні адаптуватися до нетривалої дії незначних концентрацій хлортетрацикліну, про що свідчить загальний вміст і фракційний склад білків плазми крові. Висока концентрація викликає значні зміни білкового спектру плазми крові, що порушує фізіологічні функції у риб [6].

**

Исследовано влияние хлортетрациклина на фракционный состав плазмы крови карпа. Показано, что при короткой (три дня) экспозиции невысокая концентрация не влияла, а концентрация 3,15 и 6,30 мг/дм³ вызывала снижение содержания высокомолекулярных фракций и появление белков с молекулярной массой 140—200 и 70—90 кДа.

**

The paper deals with effects of chlortetracycline on the fractional composition of carp plasma proteins. Chlortetracycline of concentration 1,1 mg/l had no effect, and 3,15 and 6,30 mg/l reduced content of proteins with molecular mass of 340—450 kDa and more, and

promoted appearance of additional protein with molecular mass 140—200 and 70—90 kDa.

**

1. *Іванова О.В., Захаренко М.О.* Санітарно-гігієнічна оцінка стоків тваринницьких підприємств // Ветеринарна біотехнологія. — 2010. — № 17. — С. 82—87.
2. *Камышиников В.С.* Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. — М.: Медпрессинформ, 2009. — 896 с.
3. *Курбатова І.М., Цегик В.В., Михальська В.М., Малюга Л.В.* До питання про якість води водойм рибогосподарського призначення та її вплив на розвиток ікри коропа (*Syrpinus carpio* L.) // Наук. вісн. Львів. нац. ун-ту вет. медицини і біотехнології. — 2008. — № 4. — С. 273—278.
4. *Курбатова І.М., Цегик В.В., Свириденко Н.П.* Розвиток ікри та виживання ембріонів коропа за дії альбендазолу / Наук. вісн. НУБіП. — 2013. — № 193. — С. 127—131.
5. *Лакін Г.Ф.* Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
6. *Луцак В.І.* Біохімічні механізми адаптації риб до умов водного середовища: аноксія, гіпоксія та фізичне навантаження: Дис. ... докт. біол. наук. — Феодосія, 2002. — 301 с.
7. *Мудра А.Є., Фальфушинська Г.І., Столяр О.Б.* Інтегральний аналіз стану антистресорних систем гепатоцитів прісноводних тварин за дії пошкоджуючих чинників середовища // Наук. зап. Терноп. пед. ун-ту. Сер. Біологія. — 2008. — № 2. — С. 151—160.
8. *Мурадова Г.Р., Рабаданова А.И.* Динамика содержания белков в сыворотке крови сеголеток карпа при хроническом воздействии тяжелых металлов // Успехи совр. естествознания. — 2012. — № 7. — С. 58—62.
9. *Уайт А., Хенгер Ф., Смит Э. и др.* Основы биохимии. — М.: Мир, 1981. — Т. 2. — 1152 с.
10. *Цугзевич Б.О., Столяр О.Б., Калінін І.В., Юкало В.Г.* Ксенобіотики: накопичення, детоксикація та виведення з живих організмів. — Тернопіль: Вид-во Терноп. нац. техн. ун-ту, 2012. — 384 с.
11. *Шандренко С.Г., Головін А.С., Дмитренко М.П. та ін.* Комп'ютерна реєстрація та аналіз результатів тонкошарової хроматографії // Журн. хромат. т-ва. — 2003. — Т. 2, № 4. — С. 22—30.
12. *Huang C.-H., Sedlak D.L.* Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surfaces water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography / tandem mass spectrometry // Environ. Toxicol. Chem. — 2001. — Vol. 20, N 1. — P. 133—139.
13. *Gulkowska A., Leung H.W., Yamashita.* Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shezhen // China Water Res. — 2008. — Vol. 42, N 1—2. — P. 395—403.
14. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // Nature. — 1970. — Vol. 227, N 5259. — P. 680—685.

Національний університет біоресурсів і
природокористування України, Київ

Надійшла 27.03.15