

УДК 597.556.31:504.45.058 + 577.125

Н. И. Силкина¹, Д. В. Микряков¹, В. Р. Микряков¹,
И. И. Руднева²

**ВЛИЯНИЕ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА
ИММУННЫЙ СТАТУС И ПАРАМЕТРЫ
ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ПЕЧЕНИ
СКОРПЕНЫ *SCORPAENA PORCUS*, ОБИТАЮЩЕЙ В
ПРИБРЕЖНЫХ ВОДАХ ЧЕРНОГО МОРЯ**

Приведены материалы исследования антимикробных свойств сыворотки крови, содержания иммунных комплексов и продуктов перекисного окисления липидов у скорпены *Scorpaena porcus*, обитающей в акваториях Черного моря с разным уровнем антропогенного загрязнения.

Ключевые слова: *Scorpaena porcus*, гуморальный иммунитет, перекисное окисление липидов, антиокислительная активность.

Антропогенное загрязнение акваторий Кавказского и Крымского побережий Черного моря в последние годы постоянно увеличивается. Наиболее интенсивному воздействию подвергаются прибрежные воды крупных промышленных центров, портовых комплексов, нефтяных терминалов, сельскохозяйственных предприятий и курортных зон. Отдельные участки акватории Черного моря утратили способность к самоочищению и представляют собой «горячие экологические точки» [3].

Общеизвестно, что рыбы, обитающие в загрязненных водоемах, отличаются более низкими темпами роста, высокой зараженностью паразитами, сокращением продолжительности жизни и увеличением естественной смертности по сравнению с рыбами из чистых акваторий [13, 17]. Это обусловлено патологиями в функционировании иммунных и биохимических механизмов адаптации к неблагоприятным факторам среды, вызванными поллютантами [8, 9, 14, 16]. Ранее у черноморской ставриды *Trachurus mediterraneus ponticus* и бычка-кругляка *Neogobius melanostomus*, выловленных в загрязненных водах г. Туапсе, было показано нарушение липидного обмена, динамического равновесия прооксидантно-антиоксидантной системы и функционального состояния гуморальных факторов иммунитета [9]. У других массовых видов рыб, обитающих в загрязненных бухтах Черного и Азовского морей, были установлены повышенные концентрации окисленных форм белков, изменение соотношения белковых фракций в сыворотке крови, а также увеличение активности ключевых антиоксидантных фермен-

© Н. И. Силкина, Д. В. Микряков, В. Р. Микряков, И. И. Руднева, 2014

тов, что свидетельствует о модифицирующем влиянии комплексного загрязнения морской среды на функциональное состояние рыб [14, 18].

В то же время информация о реакции иммуно-физиологических механизмов гомеостаза на антропогенное загрязнение у морских рыб ограничена, хотя исследование этих процессов важно для изучения влияния загрязнителей на гомеостатические механизмы адаптации, поиска биоиндикаторов оценки качества среды обитания, а также в экотоксикологических программах и мониторинге состояния здоровья рыб.

Известно, что донные формы рыб наиболее подвержены влиянию загрязнения. Среди них удобным мониторингом видом является скорпена, или морской ерш, *Scorpaena porcus* (Scorpenidae) [11] — типичный представитель ихтиофауны Черного моря и традиционный объект промыслового и любительского рыболовства, обитающий в прибрежной зоне, питающийся мелкими ракообразными (креветки, крабы, мизиды) и рыбами (бычки, атерины, зеленушки) [10]. Ранее было показано, что морфофизиологические и биохимические параметры у особей, обитающих в бухтах Севастополя с разным уровнем загрязнения, существенно различаются [11, 18, 19].

Цель работы — сравнительный анализ некоторых иммуно-биохимических показателей черноморской скорпены, обитающей в акваториях Черного моря с разным уровнем антропогенного загрязнения.

Материал и методика исследований. Материалом исследований послужили 36 половозрелых особей скорпены (средняя длина 11,5—12,0 см и масса 60—70 г), отловленных в сентябре 2008—2010 гг. в прибрежных водах Черного моря, различающихся уровнем антропогенной нагрузки: ст. 1 — вблизи устья р. Гагрышш (Абхазия), ст. 2 — вблизи устья р. Мзымты (Адлерский р-н г. Сочи, Россия), ст. 3 — акватория порта г. Туапсе (Россия) и ст. 4 — бух. Стрелецкая (г. Севастополь, Украина).

Наиболее загрязненная зона — акватория крупного морского грузо-пассажирского порта г. Туапсе, которая постоянно подвергается комплексному загрязнению нефтью, разными видами топлива, отходами нефтехимической и машиностроительной промышленности, цементного производства, судоремонтного завода, производства стройматериалов и коммунальными стоками. Прибрежные воды г. Туапсе загрязнены нефтепродуктами, концентрация которых более чем в 14 тыс. раз превышает предельно допустимые нормы (www.yuga.ru/news/114314;04/02/2008). Установлено превышение ПДК мочевины, фосфатов, нитратов, СПАВ, фенолов, сероводорода и др. (<http://blacksea-education.ru/zagr.shtml>; <http://tuapse-ecology.by.ru>). Бух. Стрелецкая, расположенная в черте г. Севастополя, считается одной из самых загрязненных, так как в нее ежедневно поступает 350 м³ сточных вод, содержащих различные токсиканты, в том числе пестициды. В бухте в наибольшей степени развито судоходство, рекреация, на ее берегах расположен судоремонтный завод, стоки которого, наряду с выпусками с кораблей, нефтепродуктами и ржавыми металлическими конструкциями, в значительной степени загрязняют морскую среду [4]. В акватории г. Сочи зафиксировано повышенное содержание нефтяных углеводородов, БПК₅, ПАВ, нитри-

тов и др. Концентрация нефтепродуктов вблизи устья р. Мзымты составляет 0,15—0,17 мг/м³ (3—3,4 ПДК) (<http://esimo.oceanography.ru/esp1/index.php...>; ежегодник качества вод, 2004 г., район Сочи — Адлер). Несмотря на высокий уровень общего загрязнения вод Черного моря, в акватории Абхазии ситуация остается достаточно благополучной. Воды в районе пос. Цандрипш (вблизи устья р. Гагрыпш) можно считать условно чистыми, поскольку здесь полностью отсутствуют промышленные предприятия, а в воду попадают только бытовые сточные воды небольших населенных пунктов.

Иммунные и биохимические показатели тканей печени и сыворотки крови рыб анализировали по бактериостатической активности сыворотки крови (БАСК), доле иммунодефицитных особей (ИМД), содержанию неспецифических иммунных комплексов (ИК) и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровню антиокислительной активности (АОА).

Определение БАСК проводили нефелометрическим методом [7]. В качестве тест-микробов использовали суточную культуру *Aeromonas hydrophila*. В зависимости от уровня БАСК определяли иммунодефицитных особей, сыворотка крови которых не угнетала развитие тест-микробов (в бух. Стрелецкой эти показатели не исследовали).

Содержание ИК в сыворотке крови устанавливали спектрофотометрически при длине волны 280 нм методом селективной преципитации с 7%-ным полиэтиленгликолем [2], адаптированным для водных организмов.

Об интенсивности ПОЛ судили по накоплению ТБК-реактивных продуктов, характеризующих процессы перекисного окисления. Их концентрацию определяли спектрофотометрически при длине волны 532 нм [1] и вычисляли с учетом коэффициента молярной экстинкции ($1,56 \times 10^5 \text{ M}\cdot\text{c}$) и выражали в наномолях на 1 г ткани.

АОА в тканях рыб устанавливали по кинетике окисления субстрата восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха [15]. Константу ингибирования окисления субстрата (КОС), являющуюся показателем антиокислительной активности ткани, определяли по формуле

$$K_i = K_{\text{конт}} - K_{\text{оп}}/C,$$

где $K_{\text{конт}}$ и $K_{\text{оп}}$ — константы скорости окисления субстрата соответственно в контроле и в опыте; C — концентрация биологического материала в кювете. Результаты исследований обрабатывали статистически при помощи стандартного пакета программ (приложение Statistica) с использованием t -теста, $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

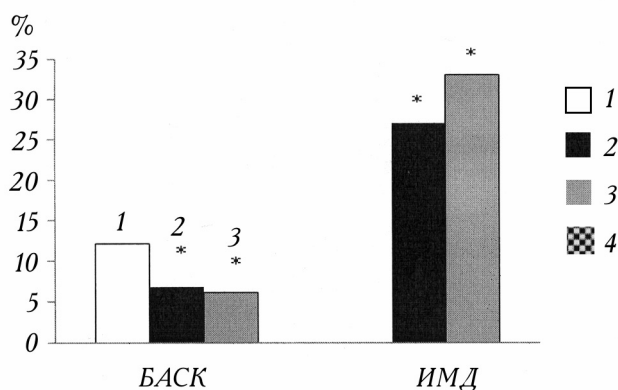
Анализ полученных результатов показал, что исследуемые показатели рыб, выловленных в акваториях с высоким уровнем антропогенной нагрузки и из условно чистого района, достоверно различались.

Уровень БАСК последовательно снижался у рыб, отловленных в устье р. Гагрыпш, устье р. Мзымты и акватории порта г. Туапсе, тогда как значения ИМД имели противоположную тенденцию (рис. 1). Можно заключить, что низкий уровень БАСК, отражающий функциональное состояние гуморальных факторов естественного иммунитета (системы комплемента, лизоцима, *b*-лизина, пропердина и др. [7]), и высокая доля ИМД особей, установленные у рыб, отловленных на ст. 2 и 3, свидетельствуют об угнетении функционального состояния иммунной системы.

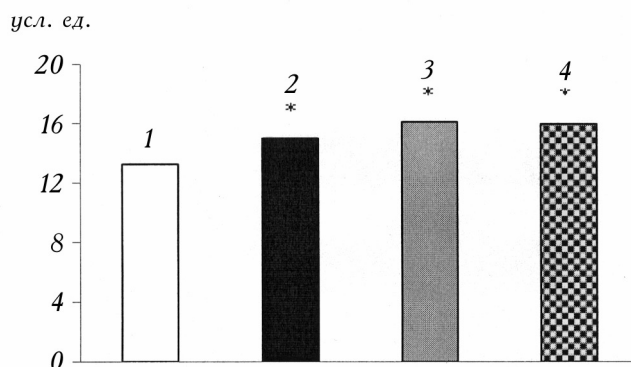
Количественные характеристики ИК печени скорпены, отловленной на ст. 1, 2, 3 и 4, последовательно возрастали (рис. 2). Это свидетельствует о насыщенности организма рыб, обитающих в загрязненных районах, ксенобиотиками и снижении клиринговой функции фагоцитарной системы по нейтрализации и удалению ИК из циркулирующей крови.

Содержание ТБК-реактивных продуктов и значения КОС в печени скорпены, отловленной на ст. 2, 3 и 4 достоверно выше, чем у особей, добытых на ст. 1 (рис. 3). Полученные результаты свидетельствуют о смещении равновесия ПОЛ ↔ АОА в сторону интенсификации процессов ПОЛ у рыб из наиболее загрязненных акваторий.

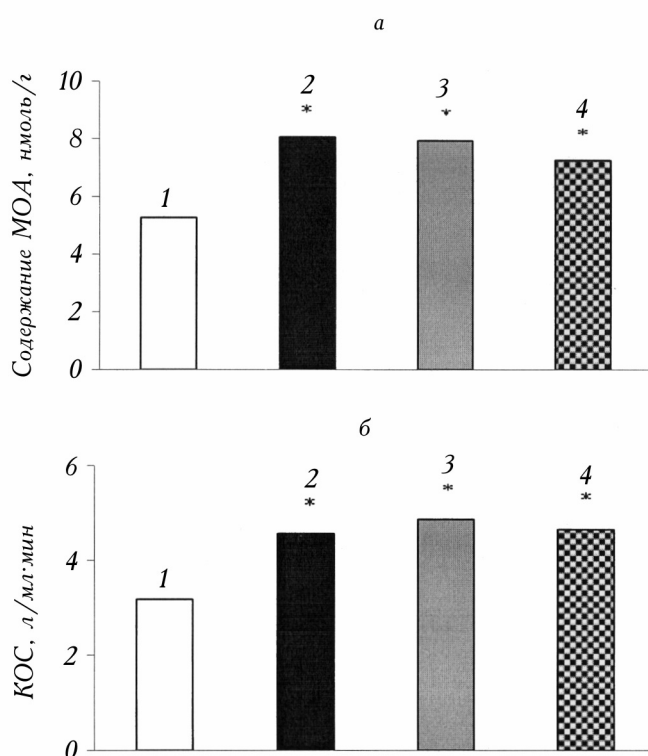
Таким образом, особи, отловленные на ст. 2, 3 и 4, отличались от особей со ст. 1 по функциональному состоянию гуморальных факторов иммунитета, доле ИМД особей и состоянию прооксидантно-антиоксидантного баланса. На фоне низких показателей БАСК и высоких — ИК у рыб, обитающих в



1. Уровень бактериостатической активности сыворотки крови и количество иммунодефицитных особей скорпены. Здесь и на рис. 2, 3: 1 — устье р. Гагрыпш; 2 — устье р. Мзымты; 3 — акватория порта г. Туапсе; 4 — бух. Стрелецкая; * отличия относительно ст. 1 достоверны при $p \leq 0,05$.



2. Содержание иммунных комплексов в печени скорпены.



3. Содержание малонового диальдегида (а) и константа ингибирования окисления субстрата (б) в печени скорпены.

акватории порта г. Туапсе, вблизи устья р. Мзымты и бух. Стрелецкой, отмечено повышенное содержание продуктов ПОЛ и снижение общей АОА тканей, что характерно для стресса, вызванного токсикантами [8, 9, 16].

Установленные изменения в функционировании иммунных и биохимических механизмов гомеостаза рыб из загрязненных акваторий следует рассматривать как типичную адаптивную реакцию на загрязняющие вещества. Известно, что ИК — комплексы, состоящие из антигена — антитела и связанных с ними компонентов системы комплемента, играют важную роль в про-

цессах регуляции иммунных реакций, элиминации ксенобиотиков из организма и поддержания иммунофизиологического гомеостаза. Избыточное образование ИК, как правило, происходит при насыщении организма чужеродными телами, в том числе аутоантигенами, инфекционными и токсическими агентами. Это обусловлено снижением клиринговой функции клеток фагоцитарной системы [5, 12] и является причиной развития неконтролируемых патологических процессов [7, 8, 12]. По-видимому, повышенное содержание ИК у рыб из загрязненных акваторий является одной из причин снижения БАСК.

Увеличение содержания продуктов ПОЛ и снижение АОА ткани печени у рыб из экологически неблагоприятных акваторий свидетельствуют об интенсификации свободнорадикальных процессов и резком уменьшении содержания антиоксидантов. Неконтролируемому нарастанию количества продуктов ПОЛ при воздействии стресс-факторов, как известно, препятствует многоуровневая система антиоксидантной защиты, состоящая из антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза) и низкомолекулярных антиоксидантов (восстановленный глутатион, α -токоферол, фенольная форма коэнзима Q_{10} , β -каротин, аскорбиновая кислота и др.) [6, 20]. Антиоксидантной системе

принадлежит важная роль в нейтрализации последствий свободнорадикальных процессов и реализации адаптивных компенсаторных реакций в организме, поскольку ее компоненты участвуют в регуляции метаболических функций и тесно взаимодействуют с иммунной системой. Интенсификация ПОЛ и снижение содержания антиоксидантов характерно для рыб при развитии окислительного стресса, вызванного неблагоприятными эндо- и экзогенными факторами. Аналогичные нарушения встречаются у гидробионтов в районах с повышенной антропогенной нагрузкой [8, 9, 14, 16, 18—20]. Учитывая, что рыбы исследуемых акваторий находятся под хроническим неблагоприятным воздействием, нельзя исключать, что отмеченные реакции иммунной и антиоксидантной защитных систем могут отражать определенную стадию адаптивного процесса, в том числе и «пост-эффекты», когда живая система переходит на новый уровень функционирования для сохранения и поддержания жизнедеятельности.

Заключение

На основании проведенных исследований можно заключить, что снижение иммунитета и возрастание параметров, характеризующих развитие окислительного стресса у рыб, обитающих в загрязненных морских акваториях, являются следствием нарушения гомеостаза их организма. Реакции всех тестируемых показателей высокочувствительны к загрязнению воды и поэтому могут служить экологическими маркерами, отражающими степень антропогенного воздействия на организм рыб, и использоваться в качестве биотеста для мониторинга акваторий и состояния здоровья их обитателей. Загрязняющие вещества, поступающие в прибрежные воды Черного моря со стоками промышленных и коммунально-бытовых предприятий, нефтяных терминалов и портовых комплексов, являются одной из причин снижения адаптивной функции иммунофизиологических механизмов рыб, что ведет к сокращению численности их популяций и снижению разнообразия рыбного населения.

**

*Наведено результати досліджень антимікробних властивостей сироватки крові, вмісту імунних комплексів і продуктів перекисного окиснення ліпідів у скорпєни (*Scorpaena porcus*) з акваторій Чорного моря з різним рівнем антропогенного забруднення. Показано залежність досліджених показників від місця існування риб.*

**

*Antimicrobial properties of blood serum and content of immune complexes and lipid peroxidation products have been analyzed in the scorpion fish (*Scorpaena porcus*) from water areas of the Black Sea with different level of anthropogenic pollution. Considered parameters were shown to depend on the fish habitats.*

**

1. Андреева Л.И., Кожемякин Н.А., Кушкун А.А. Модификация методов определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. — 1988. — № 11. — С. 41—43.
2. Гриневич Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Там же. — 1981. — № 8. — С. 493—496.

3. Кравченко Ю.А., Крицкая Е.Б. Современный мониторинг загрязнений вод Черного моря // *Фундамент. исследования.* — 2007. — № 10. — С. 80—100.
4. Красновид И.И., Озюменко Б.А. Экологическое состояние внутренних морских вод г. Севастополя // *Сб. науч. работ специалистов сан.-эпид. службы Севастополя.* — 2002. — Вып. 7. — С. 26—33.
5. Логинов С.И., Смирнов П.Н., Трунов А.Н. Иммунные комплексы у животных и человека: норма и патология. — Новосибирск: Сиб. отд-ние Ин-та эксперим. ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Россельхозакадемии, 1999. — 144 с.
6. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. — Новосибирск: АРТА, 2008. — 284 с.
7. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. — Рыбинск: ИБВВ РАН, 1991. — 153 с.
8. Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. и др. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. — М.: Наука, 2001. — 126 с.
9. Микряков В.Р., Силкина Н.И., Микряков Д.В. Влияние антропогенного загрязнения на иммунологические и биохимические механизмы поддержания гомеостаза у рыб Черного моря // *Биология моря.* — 2011. — Т. 37, № 2. — С. 142—148.
10. Никольский Г.В. Частная ихтиология. — М.: Высш. шк., 1971. — 470 с.
11. Овен Л.С., Руднева И.И., Шевченко Н.Ф. Ответные реакции морского ерша *Scorpaena porcus* (Scorpaenidae) на антропогенное воздействие // *Вопр. ихтиологии.* — 2000. — Т. 40, № 1. — С. 75—78.
12. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. — М.: Мир, 2000. — 592 с.
13. Романенко В.Д. Основы гидроэкологии. — Киев: Генеза, 2004. — 664 с.
14. Руднева И.И., Шевченко Н.Ф., Залевская И.Н., Жерко Н.В. Биомониторинг прибрежных вод Черного моря // *Вод. ресурсы.* — 2005. — Т. 32, № 2. — С. 238—246.
15. Семенов В.А., Ярош А.М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала // *Укр. биохим. журн.* — 1985. — Т. 57, № 3. — С. 50—52.
16. Силкина Н.И., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние антропогенного загрязнения на окислительные процессы в печени рыб Рыбинского водохранилища // *Экология.* — 2012. — № 4. — С. 1—5.
17. Adams S.M. Biomarker/bioindicator response profiles of organisms can help differentiate between sources of anthropogenic stressors in aquatic ecosystems // *Biomarkers.* — 2001. — N 6. — P. 33—44.
18. Kuzminova N., Rudneva I.I., Salekhova L. et al. State of black scorpion fish (*Scorpaena porcus* L., 1758) inhabited coastal area of Sevastopol region (Black Sea) in 1998—2008 // *Turkish J. of Fisheries and Aquatic Sci.* — 2011. — N 11. — P. 101—111.

19. *Rudneva I.I., Kuzminova N.S.* Effect of chronic pollution on hepatic antioxidant system of Black Sea fish species // Intern. J. of Sci. and Nature. — 2011. — Vol. 2, N 2. — P. 279—286.
20. *Winston G.W.* Oxidants and antioxidants in aquatic animals // Comp. Biochem. Physiol. — 1991. — Vol. 100, N 1—2. — P. 173—176.

¹ Институт биологии внутренних вод
РАН, Борок, РФ

² Институт биологии южных морей
НАН Украины, Севастополь

Поступила 19.09.13