

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ВОЛОДИМИРА ГНАТЮКА

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

РАБЧЕНЮК ОЛЕНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК (577.122+577.123+577.125) : (597.551.2+ 597.552.1): 546.723

ДИСЕРТАЦІЯ

**ВПЛИВ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ФЕРУМУ У ВОДІ
НА МЕТАБОЛІЧНІ ПРОЦЕСИ В ОРГАНІЗМІ КОРОПА ТА ЩУКИ**

03.00.10 – іхтіологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

(підпис здобувача) О.О. Рабченюк

Науковий керівник: Курант Володимир Зіновійович, доктор біологічних наук, професор

Тернопіль – 2019

АНОТАЦІЯ

Рабченюк О.О. Вплив підвищених концентрацій Феруму у воді на метаболічні процеси в організмі коропа та щуки. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) зі спеціальності 03.00.10 «Іхтіологія». – Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Тернопіль, 2019.

У роботі висвітлено роль окремих ланок білково-нуклеїнового та ліпідного обміну в організмі прісноводних риб у адаптації до дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у водному середовищі. Дослідження проведено на дворічках коропа (*Cyprinus carpio* L.) і щуки (*Esox lucius* L.) з середньою масою 300-350 г. Дослідних риб виловлювали із ставків Тернопільського рибкомбінату, урочище Залісці. Кількісна сторона і біохімічні механізми впливу різних концентрацій іонів Феруму на ліпідний та білково-нуклеїновий обмін прісноводних риб на даний час вивчені недостатньо. Вкрай обмежена інформація з питань впливу іонів Феруму на ліпідний склад клітин різних тканин риб позбавляє екотоксикологічні дослідження значної інформаційної бази, яку можна використовувати для діагностики екотоксикологічної ситуації. Зважаючи на вищесказане вивчали вплив іонів Fe^{3+} на риб в концентраціях 0,2 і 0,5 мг/дм³, що відповідали 2 та 5 рибогосподарським ГДК.

Накопичення рибами Феруму є активним і регульованим тканинноспецифічним процесом. Інтенсивність цього процесу залежить від концентрації металу у воді, а також від фізіолого-біохімічної активності організму риб. Так, відмічене зростання вмісту Феруму у 1,5 і 2,1 рази у зябрах коропа і щуки відповідно за дії 0,5 мг/дм³ іонів Fe^{3+} . У нирках коропа мало місце зменшення у 1,4 рази кількості металу за впливу 0,5 мг/дм³ іонів Fe^{3+} , а у нирках щуки вміст Феруму знижувався в 1,5 рази

за дії 0,2 мг/дм³ іонів Феруму (III), що підкреслює ключову роль зябер та нирок у регуляції кількості металу в організмі даних видів риб.

Зміни у перерозподілі Купруму та Мангану у тканинах прісноводних риб, викликані підвищеними концентраціями іонів Феруму (III), в першу чергу визначаються їх видовими особливостями. Так, у коропа за впливу підвищених концентрацій іонів Феруму у воді (0,5 мг/дм³) мають місце зміни у розподілі Мангану між печінкою, зябрами та нирками; для Купруму відмічено модуляцію його вмісту у печінці та зябрах риб за дії 0,5 мг/дм³ іонів Fe³⁺. У щуки, насамперед, слід відмітити зростання кількості Купруму в тканинах м'язів та нирок за впливу обох концентрацій іонів Феруму (III) та зниження вмісту Купруму за дії 0,2 мг/дм³ іонів Fe³⁺. Виявлене явище може свідчити про те, що у цих двох видів риб функціонують різні механізми підтримання оптимального вмісту металів у їх організмі.

Встановлено зростання кількості РНК у печінці коропа і м'язах щуки та зниження вмісту її в печінці щуки і м'язах коропа за підвищених концентрацій іонів Fe³⁺. Кількість ДНК знижується в печінці коропа та м'язах щуки за дії обох досліджуваних концентрацій іонів Fe³⁺ і зростає в печінці щуки (лише за дії 0,5 мг/дм³) та м'язах коропа. Зміни співвідношення РНК/ДНК та чисел метаболічної активності за дії іонів Феруму свідчать про посилення експресії геному та біосинтезу білків, що підтверджується зростанням загальної кількості цих біополімерів у досліджуваних тканинах риб.

Реакція систем переамінування за дії іонів Феруму має тканинну та видову специфіку і залежить від концентрації металу у водному середовищі. Так, як в печінці, так і сироватці крові коропа за дії 0,5 мг/дм³ іонів Fe³⁺ активність аланінамінотрансферази зростає. Активність аспартатамінотрансферази за впливу підвищених концентрацій іонів Феруму зростає в печінці та знижується в сироватці крові коропа, пропорційно до концентрації іонів Fe³⁺ у середовищі.

Активність аланінамінотрансфери в печінці щуки знижується при обох значеннях досліджуваних концентрацій іонів Феруму (III). У сироватці крові риб відмічене зростання як аланін-, так і аспартатамінотрансфери лише за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу. Реакція системи переамінування в тканинах досліджених прісноводних риб за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} свідчить про перебудову амінокислотного та білкового метаболізму з метою забезпечення енергетичної та пластичної адаптації до стрес-дії токсиканта.

За впливу $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} прослідковується зростання вмісту гемоглобіну і білка у плазмі крові коропа та зниження концентрації гемоглобіну у щуки. Активність лактатдегідрогенази зростає за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} як у щуки, так і у коропа, що свідчить про активацію анаеробного енергозабезпечення та пригнічення циклу трикарбонових кислот. Підвищений вміст іонів Fe^{3+} у воді призводив до зростання кількості металу в плазмі крові обох видів риб та збільшення показника насичення трансферину залізом (особливо у щуки).

Зміни вмісту ліпідів у тканинах риб за дії іонів Fe^{3+} визначаються концентрацією іонів металу в воді, різною активністю тканин та екологічними особливостями досліджених видів риб. Так, у зябрах обох видів риб за дії іонів Fe^{3+} знижується вміст холестеролу та показник відношення холестерол/фосфоліпіди. Зміни вмісту жирних кислот, моно-, ди- та триацилгліцеролів у клітинах зябер мають різну направленість та залежать від концентрації іонів металу у воді та виду риб. У печінці коропа та щуки вплив іонів Fe^{3+} призводив до порушення синтезу холестеролу і фосфоліпідів та посилення ліполітичних процесів. У нирках риб за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} , в цілому, відмічено активацію катаболічних процесів. Відмічено активне використання ліпідних резервів м'язів риб для енергетичного забезпечення трансформації Феруму в організмі коропа за дії іонів Fe^{3+} , на що вказує зменшення кількості триацилгліцеролів, та зростання кількості продуктів їх гідролізу.

Вплив підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} , в цілому, викликає активацію ліполізу у тканинах печінки та зябер досліджуваних видів риб, про що свідчить зростання вмісту лізофосфатидилхоліну та зменшення – фосфатидилхоліну, фосфатидилсерину і фосфатидилінозитулу. Зміни вмісту полярних ліпідів у печінці та зябрах риб за дії іонів Fe^{3+} є видоспецифічними та визначаються їх концентрацією у воді. Модуляція ліпідного спектру тканин риб спрямована на забезпечення структурно-функціональної активності біологічних мембран з метою регулювання надходження і виведення Феруму з організму риб та підтримання енергетичного статусу їх організму для протидії токсичному чиннику.

Ініціація вільнорадикального окиснення і утворення його продуктів має індивідуальний характер для кожного виду риб та виражену тканинну специфіку. У зябрах риб при невисокій концентрації Феруму ($0,2 \text{ мг/дм}^3$) антиоксидантна система значною мірою інактивує вільні радикали, про що свідчить зростання, в цілому, активності досліджуваних ферментів та зниження кількості продуктів ПОЛ. При цьому у коропа ключову роль у знешкодженні АФК відіграє СОД, а у щуки каталаза, про що свідчить зростання їх активності у тканинах зябер. Високі концентрації іонів Fe^{3+} ($0,5 \text{ мг/дм}^3$) посилюють процеси перекисного окиснення ліпідів в зябрах та печінці риб, на що вказує підвищення вмісту дієнових кон'югатів та гідропероксидів ліпідів.

Слід відзначити відносну збалансованість процесів ПОЛ та антиоксидантного захисту в організмі риб за умов підвищених концентрацій іонів Феруму у воді, про що свідчить відсутність накопичення кінцевих продуктів ПОЛ у тканинах коропа та щуки.

Одержані у дисертаційній роботі результати (зміни вмісту гемоглобіну крові, Феруму та білка в плазмі крові, насичення трансферину залізом та активності лактатдегідрогенази в плазмі крові, кількості продуктів пероксидації і активності ферментів пероксидації в зябрах та печінці риб) можуть бути використані як біомаркери інтоксикації

організму риб іонами Fe^{3+} та для біоіндикації забруднення прісноводних водойм сполуками Феруму.

Ключові слова: короп, щука, Ферум, адаптація, метаболізм, білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди.

ABSTRACT

Rabchenyuk O.O. Influence of increased concentrations of Ferum in water on metabolic processes in the organism of carp and pike. – Manuscript.

Thesis for obtaining the Doctor of Philosophy degree (PhD) in Biological Sciences, specialty 03.00.10 «Ichthyology». – Ternopil National Pedagogical University of Volodymyr Hnatyuk, Ternopil, 2019.

The work deals the role of some links of protein-nucleic and lipid metabolism in the organism of freshwater fish in adaptation to the action of elevated concentrations of Fe^{3+} ions in water environment is illustrated. The study was conducted on two years old carp (*Cyprinus carpio* L.) and pike (*Esox lucius* L.) with the middle weight 300-350 g. Experimental fish were caught from the ponds of the Ternopil Fish Combinat, the Zalis'ky region. The quantitative side and biochemical mechanisms of the influence of various concentrations of iron ions on the lipid and protein nucleic metabolism in freshwater fish have not been studied sufficiently. Extremely limited information of the effects of iron ions on the lipid composition of cells of various fish tissues deprives ecotoxicological studies of a significant information base, that can be used to the diagnose of ecotoxicological situation. In view of the foregoing, the effects of Fe^{3+} ions on fish in concentrations of 0.2 and 0.5 mg/dm³, which corresponded to 2 and 5 fishmeal MPC, were studied.

The accumulation of iron by fishes is an active and regulated tissue-specific process. The intensity of this process depends on the concentration of metal in water, as well as on the physiological and biochemical activity of the organism of fish. Thus, the increase in the content of iron in the 1.5 and 2.1 times in the carp and pike gills, respectively with the action of 0.5 mg/dm³ of

Fe^{3+} ions was noted. In carp kidneys there was a decrease in 1.4 times the amount of metal due to the effect of 0.5 mg/dm^3 of Fe^{3+} ions, and in the kidneys of the pike, the iron content was reduced by 1.5 times with the action of 0.2 mg/dm^3 of iron (III) ions, which emphasizes the key role of gills and kidneys in regulating the amount of metal in the body of these fish species.

Changes in the redistribution of Copper and Manganese in freshwater fish tissues caused by increased concentrations of Iron (III) ions, which are primarily determined by their species peculiarity. Thus, in the carp, under the influence of increased concentrations of iron ions in water (0.5 mg/dm^3), there are changes in the distribution of Manganese between the liver, gills and kidneys; for Copper, was observed the modulation of its content in the liver and gills of fish with the action of 0.5 mg/dm^3 of Fe^{3+} ions. In pike, first of all, should be noted the growth of the amount of Copper in muscle and kidney tissues under the influence of both concentrations of Iron (III) ions and the decrease in the content of Copper in the action of 0.2 mg/dm^3 of Fe^{3+} ions. The detected phenomenon may indicate, that in these two species of fish function different mechanisms for maintaining the optimal content of metals in their organism.

The growth of the amount of RNA in the carp liver and muscle of the pike and the decrease of its content in the liver of pike and carp at increased concentrations of Fe^{3+} ions has been established. The amount of DNA is reduced in the liver of carp and muscle of the pike with the action of both investigated concentrations of Fe^{3+} ions and increases in the liver of the pike (only with the action of 0.5 mg/dm^3) and carp muscle. Changes in the ratio of RNA/DNA and the numbers of metabolic activity under the action of iron ions indicate an intensify in genome expression and biosynthesis of proteins, that evidenced by an increase in the total number of these biopolymers in investigated fish tissues.

The reaction of the systems of reamination under the action of the iron ions has a tissue and species specificity and depends on the concentration of the metal in the water environment. So, both in the liver and in the blood serum of the carp with the action of 0.5 mg/dm^3 of Fe^{3+} ions the activity of the

alanineaminotransferase increases. The activity of aspartateaminotransferase due to the increased concentrations of iron ions increases in the liver and decreases in the blood serum of carp, proportional to the concentration of Fe^{3+} ions in the environment.

The activity of the alanineaminotransferase in the liver of the pike decreases with both values of the investigated concentrations of iron (III) ions. In the blood serum of fish, the growth of both alanine and aspartateaminotransferase was observed only at the action of 0.2 mg/dm^3 of metal ions. The reaction of the system of reamination in the tissues of investigated freshwater fish under the influence of the increasing concentrations of Fe^{3+} ions suggests about the reconstruction of the aminoacid and protein metabolism in order to provide energy and plastic adaptation to the stress-action of the toxicant.

The influence of 0.5 mg/dm^3 of Fe^{3+} ions results in an increase of hemoglobin and protein content in the blood plasma of the carp and a decrease in the concentration of hemoglobin in the pike. The activity of lactate dehydrogenase increases with 0.5 mg/dm^3 of Fe^{3+} ions both in pike and carp, which indicates about the activation of anaerobic energy supply and inhibition of the tricarboxylic acid cycle. The high content of Fe^{3+} ions in water resulted in the increase of the amount of metal in the blood plasma of both species of fish and an increase in the saturation index of transferrin by iron (especially in pike).

Changes in the content of lipids in fish tissues under the action of Fe^{3+} ions are determined by the concentration of metal ions in water, different tissue activity and ecological characteristics of investigated species of fish. So, in the gills of both fish species under the actions of Fe^{3+} ions decreases the content of cholesterol and increased the ratio of cholesterol/phospholipids. Changes in the content of fatty acids, mono-, di- and triacylglycerols in gills cells have different orientations and depend on the concentration of metal ions in water and species of fish. In the liver of carp and pike the influence of Fe^{3+} ions leads to the violation of the synthesis of cholesterol and phospholipids and to increasing of

lipolytic processes. In the kidneys of fish under the action of elevated concentrations of Fe^{3+} ions, in general, the activation of catabolic processes has been noted. The active use of lipid reserve of muscle of fish for the energy supply of iron transformation in the carp organism according to the action of Fe^{3+} ions has been noted, for what indicating a decrease in the number of triacylglycerols, and an increase in the amount of products of their hydrolysis.

The effect of elevated concentrations of Fe^{3+} ions, in general, causes activation of lipolysis in liver and gills tissues of investigated species of fish, as evidenced by the increase in the content of lysophosphatidylcholine and the reduction of – phosphatidylcholine, phosphatidylserine and phosphatidylinositol. Changes in the content of polar lipids in the liver and gills of fish with the action of Fe^{3+} ions are species specific and determined by their concentration in water. The modulation of the lipid spectrum of fish tissues is aimed at ensuring the structural and functional activity of biological membranes in order to regulate the intake and removal of iron from the organism of fish and maintain the energy status of their organism for counteracting the toxic factor.

The initiation of free radical oxidation and the formation of its products has an individual character for each species of fish and a pronounced tissue specificity. In gills of fish at a low concentration of iron (0.2 mg/dm^3) the antioxidant system largely inactivates free radicals, as evidenced by the growth, in general, of the activity of the studied enzymes and the decrease in the amount of LPO products. At the same time in the carp the key role in disfusion of the AFO plays SOD, and in the pike catalase, as evidenced by the increase of their activity in the tissues of the gills. High concentrations of Fe^{3+} ions (0.5 mg/dm^3) increase the lipid peroxidation processes in gills and liver of fish, indicating an increase in the content of diene conjugates and lipid hydroperoxides.

It should be noted the relative balance of the processes of LPA and antioxidant protection in the organism of fish in conditions of increased concentrations of iron ions in water, as evidenced by the lack of accumulation of end products of LPA in carp and pike tissues.

The obtained results in the dissertation (changes in the content of blood hemoglobin, iron and protein in blood plasma, the saturation of transferrin by iron and the activity of lactatedehydrogenase in blood plasma, the number of peroxidation products and the activity of peroxidation enzymes in gills and liver of fish) can be used as biomarkers of intoxication of fish with ions Fe^{3+} and for the bioindication of pollution of freshwater ponds with iron compounds.

Key words: carp, pike, iron, adaptation, metabolism, proteins, nucleic acid, lipids.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових виданнях

1. **Рабченко О.О.**, Хоменчук В.О., Курант В.З. Вплив підвищених концентрацій йонів Fe^{3+} на гематологічні показники коропа та щуки. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія*. 2015. № 2 (63). С. 28–31. (участь у проведенні експериментів, обробці даних та написанні статті).

2. **Рабченко О.О.**, Бияк В.Я., Хоменчук В.О., Курант В.З. Активність трансаміназ в організмі прісноводних риб за дії йонів заліза. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія*. 2016. № 1 (65). С. 130–134. (проведення експериментів, участь в аналізі даних та написанні статті).

3. **Рабченко О.О.**, Хоменчук В.О., Курант В.З. Ферум у водних екосистемах: форми знаходження, біологічне значення та токсичність для риб. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія*. 2016. № 3–4 (67). С. 107–119. (участь у проведенні експериментів, обробці даних та написанні статті).

4. **Рабченко О.О.**, Хоменчук В.О., Курант В.З., Грубінко В.В. Фосфоліпідний склад окремих тканин коропа та щуки за дії йонів Fe^{3+} . *Доповіді Національної академії наук України*. 2017. № 1. С. 97–102. (відбір та обробка матеріалу, аналіз даних та участь у написанні статті).

5. **Рабченюк О.О.**, Хоменчук В.О., Ляврін Б.З., Курант В.З. Накопичення феруму в організмі прісноводних риб за його підвищеного вмісту у водному середовищі. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія*. 2017. № 1 (68). С. 96–101. (проведення експериментів, участь в аналізі даних та написанні статті).

6. **Rabcheniuk O.O.**, Biyak V.Ya., Khomenchuk V.O. & Kurant V.Z. Protein-nucleic metabolism in freshwater fishes under impact of ferum ions. *Hydrobiological Journal*. 2017. Vol. 53, Iss. 4. P. 85–93. (відбір та обробка матеріалу, аналіз даних та участь у написанні статті).

7. **Рабченюк О.О.** Вплив підвищених концентрацій йонів Fe^{3+} у воді на вміст заліза та трансферину у плазмі крові риб. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія*. 2018. № 2 (73). С. 83–87. (проведення експериментів, участь в аналізі даних та написанні статті).

8. **Рабченюк О.О.**, Хоменчук В.О., Сеник Ю.І., Курант В.З. Ліпідний обмін в організмі коропа і шуки за дії йонів феруму (III). *Гідробіологічний журнал*. 2018. Т. 54, № 5. С. 71–80. (участь у проведенні експериментів, обробці даних та написанні статті).

9. **Рабченюк О.О.**, Хоменчук В.О., Станіславчук Г.В., Згурська С.Б. Курант В.З. Особливості перекисного окиснення ліпідів риб за умов підвищених концентрацій йонів Fe^{3+} . *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія*. 2018. № 3–4 (74). С. 38–46. (відбір та обробка матеріалу, аналіз даних та участь у написанні статті).

Матеріали та тези доповідей конференцій

10. **Рабченюк О.О.**, Голіней Г.М., Марценюк В.М, Сідлецька О.В., Хоменчук В.О. Вплив підвищених концентрацій Fe^{3+} на деякі показники крові коропа. *Концепція сталого розвитку та її реалізація в освіті* : матеріали науково-практичної конференції, присвяченої 75-річчю ТНПУ ім. В. Гнатюка та хіміко-біологічного факультету, 16–18 квітня 2015 р. Тернопіль : Видавн. відділ ТНПУ ім. В. Гнатюка, 2015. С. 91–93.

11. **Рабченко О.О.**, Хоменчук В.О., Бияк В.Я., Курант В.З. Вплив йонів заліза на активність білково-нуклеїнового обміну в організмі коропа та щуки. *Сучасні проблеми теоретичної і практичної іхтіології* : матеріали IX Міжнародної іхтіологічної науково-практичної конференції, 14–16 вересня 2016 р. Одеса : ТЕС, 2016. С. 217–220. (участь у відборі і обробці матеріалу та аналізі даних).

12. **Рабченко О.О.**, Хоменчук В.О., Далєвський В.М., Курант В.З. Вплив підвищених концентрацій йонів Fe^{3+} на вміст фосфоліпідів в окремих тканинах прісноводних риб. *Сучасні проблеми теоретичної і практичної іхтіології* : матеріали IX Міжнародної іхтіологічної науково-практичної конференції, 14–16 вересня 2016 р. Одеса : ТЕС, 2016. С. 221–224.

13. **Рабченко О.**, Хоменчук В., Гладюк М., Далєвський В., Курант В. Особливості ліпідного складу клітинних мембран печінки та зябер риб за дії йонів Fe^{3+} . *Актуальні проблеми сучасної біохімії* : матеріали Міжнародної наукової конференції, присвяченій до 100-річчя від Дня народження професора Бориса Федоровича Сухомлинова, 16–18 листопада 2016 р. Львів : Вісник Львівського університету. Серія біологічна, 2016. Випуск 73. С. 121.

14. **Рабченко О.О.**, Луцик З.М., Хоменчук В.О., Курант В.З. Особливості ліпідного складу тканин печінки та зябер риб за дії підвищених концентрацій йонів Fe^{3+} . *Біологічні дослідження – 2017* : збірник наукових праць VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, 14–16 березня 2017 р. Житомир : ПП «Рута», 2017. С. 141–143. (участь у проведенні експериментів, обробці даних та написанні матеріалів).

15. Курант В.З., Хоменчук В.О., **Рабченко О.О.**, Далєвська Д.Я., Ляврін В.З. Метали як регулятори білкового обміну в організмі прісноводних риб. *ТЕРНОПІЛЬСЬКІ БІОЛОГІЧНІ ЧИТАННЯ — TERNOPIL BIOSCIENCE — 2017* : матеріали Всеукраїнської науково-

практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 20-річчю заснування наукового фахового видання України «Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія Біологія», 20–22 квітня 2017 р. Тернопіль : «Терно-граф», 2017. С. 132–135.

16. **Рабченко О.О.**, Хоменчук В.О., Станіславчук А.В., Ковалик І.Г., Курант В.З. Зв'язування заліза трансферином плазми крові коропа та шуки за умов підвищених концентрацій йонів Fe^{3+} у водному середовищі. *ТЕРНОПІЛЬСЬКІ БІОЛОГІЧНІ ЧИТАННЯ — TERNOPIL BIOSCIENCE — 2018* : матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, 19–21 квітня 2018 р. Тернопіль : «Вектор», 2018. С. 127–130.

17. Хоменчук В.О., **Рабченко О.О.**, Станіславчук А.В., Курант В.З. Вільнорадикальне перекисне окиснення ліпідів у тканинах риб за дії Феруму (III). *Сучасні проблеми теоретичної та практичної іхтіології* : матеріали XI Міжнародної іхтіологічної науково-практичної конференції, 18–20 вересня 2018 р. Львів, 2018. С. 82–85. (участь у проведенні експериментів, обробці даних та написанні матеріалів).

18. **Рабченко О.**, Гудзь К., Гаврилюк Х., Хоменчук В., Курант В. Активність каталази та супероксиддисмутази в тканинах риб за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді. *Розвиток сучасної освіти і науки: результати, проблеми, перспективи* : матеріали V Міжнародної науково-практичної конференції. Конін–Ужгород –Херсон –Кривий Ріг : Посвіт, 2018. С. 397–399.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	17
ВСТУП	18
РОЗДІЛ I. ФЕРУМ У ГІДРОЕКОСИСТЕМАХ, ЙОГО БІОЛОГІЧНА РОЛЬ, ТОКСИЧНІСТЬ ТА МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ.....	24
1.1. Форми знаходження Феруму в природних водах.....	24
1.2. Методи аналізу та контролю Феруму в гідроекосистемах	27
1.3. Трансформація та токсичність Феруму для гідробіонтів	32
1.3.1. Біологічна роль та метаболізм Феруму в організмі тварин	34
1.3.2. Токсична дія Феруму на організм риб	40
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	44
2.1. Відбір досліджуваних тканин	44
2.2. Дослідження вмісту металів у тканинах риб	45
2.3. Визначення вмісту нуклеїнових кислот, білків та їх метаболічної активності у тканинах коропа та щуки	45
2.4. Дослідження активності аланін- та аспартатамінотрансферази	46
2.5. Дослідження загальних показників крові та вмісту трансферину у плазмі крові риб	46
2.6. Визначення вмісту ліпідів та їх окремих класів у тканинах досліджуваних риб.....	47
2.7. Дослідження процесів перекисного окиснення ліпідів в тканинах риб.....	49
РОЗДІЛ III. ОСОБЛИВОСТІ НАКОПИЧЕННЯ ТА РОЗПОДІЛУ ОКРЕМИХ МЕТАЛІВ У ТКАНИНАХ РИБ ЗА УМОВ ПІДВИЩЕНОГО ВМІСТУ ІОНІВ Fe^{3+} У ВОДНОМУ СЕРЕДОВИЩІ.....	52

3.1. Накопичення Феруму в окремих тканинах коропа та щуки за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді	53
3.2. Особливості перерозподілу Купруму та Мангану в тканинах коропа та щуки за умов підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді	58
РОЗДІЛ IV. БІЛКОВО-НУКЛЕЇНОВИЙ ОБМІН В ОРГАНІЗМІ КОРОПА ТА ЩУКИ ЗА ДІЇ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ФЕРУМУ (III) У ВОДІ	63
4.1. Вміст нуклеїнових кислот в тканинах риб за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді	64
4.2. Вплив підвищених концентрацій іонів Феруму (III) на вміст білків в тканинах коропа та щуки	66
4.3. Метаболічна активність синтезу білків та нуклеїнових кислот в тканинах риб за дії підвищених концентрацій Феруму (III) у воді	68
4.4. Активність ферментів переамінування в тканинах коропа та щуки за умов підвищених концентрацій Fe^{3+} у воді	70
4.4.1. Активність АЛАТ та АсАТ в тканинах коропа за умов підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді	72
4.4.2. Активність АЛАТ та АсАТ в тканинах щуки за умов підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді.....	74
РОЗДІЛ V. РОЛЬ КРОВІ РИБ У ЇХ АДАПТАЦІЇ ДО ДІЇ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ФЕРУМУ (III) У ВОДІ	78
5.1. Загальні показники крові риб за дії іонів Феруму (III)	78
5.2. Особливості зв'язування Феруму трансферином плазми крові коропа та щуки	80
РОЗДІЛ VI. ВПЛИВ ІОНІВ ФЕРУМУ (III) НА ЛІПІДНИЙ ОБМІН ТА ПРОЦЕСИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ В ТКАНИНАХ КОРОПА ТА ЩУКИ.....	85

6.1. Вплив іонів Fe^{3+} на ліпідний склад досліджуваних тканин риб	85
6.2. Роль фосфоліпідів у формуванні стійкості організму риб до підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді	95
6.3. Вміст продуктів вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів у зябрах та печінці коропа за дії Феруму (III) у воді.....	109
6.4. Активність каталази та супероксиддисмутази в тканинах риб за умов підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді	115
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	123
ВИСНОВКИ.....	131
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	134

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ТАГ – триацилгліцероли
ДАГ – диацилгліцероли
НЕЖК – неестерифіковані жирні кислоти
ХЛ – холестерол
МАГ – моноацилгліцероли
ФЛ – фосфоліпіди
ЛФХ – лізофосфатидилхолін
ФС – фосфатидилсерин
ФЕА – фосфатидилетаноламін
ФХ – фосфатидилхолін
СМ – сфінгомієлін
ФІ – фосфатидилінозитол
КЛ – кардіоліпін
СДГ – сукцинатдегідрогеназа
ЦО – цитохромоксидаза
ЛДГ – лактатдегідрогеназа
ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів
АФК – активні форми кисню
ГДК – гранично допустимі концентрації
СОД – супероксиддисмутаза
АлАТ – аланінамінотрансфераза
АсАТ – аспартатамінотрансфераза
рН – водневий показник
ТБК – тіобарбітурова кислота
МДА – малоновий диальдегід
ПВК – піровиноградна кислота

ВСТУП

Актуальність теми. Всезростаюче використання важких металів за останні десятиліття призвело до збільшення надходження їх сполук у водне середовище [159, 269].

Основна проблема забруднення важкими металами пов'язана з їх високою токсичністю та здатністю до біоаккумуляції в біологічних системах [209].

Токсична дія металів призводить до ряду шкодочинних ефектів, таких як імунодепресія [145, 203], індукція стресових білків [197, 217, 251], окислювальний стрес [122, 126, 164, 242], гістопатологічні ушкодження [102, 153, 205, 246], зменшення репродуктивного потенціалу та ендокринні порушення [128, 136], канцерогенез [144] тощо.

Метали, особливо в іонній формі, швидко зв'язуються з пограничними епітеліальними структурами гідробіонтів, стають біодоступними і легко проходять через фосфоліпіди клітинних мембран, завдаючи шкоди через нездатність їх до метаболізму [51, 118, 248, 267].

Форма знаходження металів у воді, температура, рН, комплексоутворення та цілий ряд інших чинників значною мірою впливають на біодоступність та токсичність металів у водному середовищі [14].

Ферум є одним з найбільш поширених елементів у земній корі, але через низьку міграційну здатність концентрація металу в природних водах дуже мала і його прийнято відносити до числа мікроелементів [267].

Дослідження впливу Феруму на метаболізм тварин проведені в основному на ссавцях [90], тоді як вплив підвищених концентрацій даного металу на рибу є дослідженим недостатньо. Разом з тим відомо [153], що біоконцентрування Феруму водними тваринами здійснюється за низьких концентрацій і є важливим з екологічної точки зору. Нормальне функціонування організму визначається наявністю оптимальної кількості

металів та формою їх знаходження в організмі [267]. Нестача його може викликати ряд захворювань або призводити до смерті, адже Ферум є необхідним металом для життя тварин. Він входить до складу низки гемових (гемоглобін, мітохондріальні та мікросомальні цитохроми, каталаза та ін.) та негемових (трансферин, феритин, мітоферин тощо) протеїнів та відіграє важливу роль в окисно-відновних процесах клітини [61, 267]. Однак біонакопичення Феруму може становити потенційну небезпеку навіть за незначного зростання концентрації металу у воді. Це пов'язано з тим, що біологічна функція Феруму у організмі риб здійснюється за низьких концентрацій, а надмірне його акумулювання може призводити до хронічного чи гострого отруєння [112, 153, 155].

Зважаючи на це, актуальним є пошук біомаркерних показників в організмі риб, які б дозволили оцінити негативні наслідки дефіциту чи надлишку Феруму. Такі дослідження також допоможуть оцінити рівень забрудненості водного середовища сполуками Феруму, адже риби є цінними біоіндикаторами, оскільки підготовка зразків риби та хімічний аналіз відносно простий, більш швидкий та інформативний, менш затратний порівняно з традиційними аналізами води та донних відкладів [225]. Окрім того, риби знаходяться на вершині водних харчових ланцюгів і добре відображають забруднення водних екосистем металами [187].

Метаболічно активні тканини, такі як зябра, печінка, нирки та м'язи, володіють високою здатністю до біоаккумуляції і як правило використовуються для оцінки забруднення води металами [238]. Токсикологічні дослідження показали, що окремі біохімічні параметри печінки риб, дозволяють оцінити ступінь і тип забруднення водних екосистем [238].

Ліпіди, білки та нуклеїнові кислоти виконують важливі функції в клітинному метаболізмі і відіграють істотну роль у біохімічних адаптаціях риб до несприятливих чинників водного середовища, у тому числі і до металів. Опубліковано низку робіт [3, 39, 64, 71, 186], які засвідчують

важливе екологічне значення окремих сторін ліпідного та білково-нуклеїнового обміну у риб і їх адаптаціях до температури, сезонного чинника, іонів металів тощо.

Разом з тим, кількісна сторона і біохімічні механізми впливу різних концентрацій іонів Феруму на ліпідний та білково-нуклеїновий обмін на даний час вивчені недостатньо. Вкрай обмежена інформація з питань впливу іонів Феруму на ліпідний склад клітин різних тканин риб позбавляє екотоксикологічні дослідження значної інформаційної бази, яку можна використовувати для діагностики екотоксикологічної ситуації.

Саме тому особливий інтерес викликає дослідження участі ліпідів, білків та нуклеїнових кислот окремих тканин риб в їх адаптації до дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} .

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Робота була складовою частиною досліджень лабораторії екологічної біохімії кафедри хімії та методики її навчання Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка і виконувалася в рамках науково-дослідницьких тем держбюджетної тематики Міністерства освіти і науки України: «Фізіолого-біохімічні механізми формування токсикорезистентності в організмі водних тварин» (2012 – 2016 рр., номер держреєстрації 0112U000275) та «Пошук фізіолого-біохімічних маркерів для оцінки забруднення металами прісноводних екосистем за допомогою риб» (2017 – 2021 рр., номер держреєстрації 0117U002180).

Мета і завдання дослідження. Метою дослідження було з'ясувати роль окремих ланок білково-нуклеїнового та ліпідного обміну в організмі прісноводних риб у процесах адаптації до дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у водному середовищі.

Поставлена мета була реалізована внаслідок вирішення таких завдань:

- дослідити біонакопичення Феруму у печінці, зябрах, нирках та м'язах коропа і щуки за умов підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді;
- встановити особливості перерозподілу Мангану та Купруму в печінці, зябрах, нирках та м'язах риб за умов підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} ;
- дослідити вплив підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} на вміст нуклеїнових кислот і білків, а також їх метаболічну активність в тканинах коропа та щуки;
- дослідити роль процесів переамінування в адаптації риб до підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді;
- встановити вплив підвищених концентрацій іонів Феруму (III) на гематологічні показники та особливості зв'язування Феруму трансферином плазми крові у коропа та щуки;
- оцінити ліпідний спектр окремих тканин коропа та щуки за умов підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді;
- проаналізувати вплив підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} на систему антиоксидантного захисту в організмі риб;
- проаналізувати можливість використання досліджуваних показників для оцінки забруднення водного середовища іонами Феруму.

Об'єкт дослідження: адаптація прісноводних риб до антропогенних чинників водного середовища.

Предмет дослідження: білково-нуклеїновий та ліпідний обмін в тканинах коропа та щуки за умов впливу підвищених концентрацій Феруму у воді.

Методи дослідження: загальноприйняті методи відбору досліджуваних тканин, іхтіологічні методи, атомно-адсорбційна спектроскопія, тонкошарова хроматографія, фотометрія, імунологічні, варіаційно-статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. В результаті дослідження вперше встановлено особливості перерозподілу Феруму,

Мангану і Купруму, співвідношення нейтральних та полярних ліпідів у зябрах, печінці, нирках та м'язах риб за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} . Вперше проаналізовано особливості зв'язування Феруму трансферином плазми крові коропа та щуки за умов впливу сублетальних концентрацій іонів Феруму. Розширено знання про роль білково-нуклеїнового і ліпідного обміну в формуванні токсикорезистентності організму риб до дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді та можливість використання отриманих результатів для оцінки стану популяцій риб.

Практичне значення одержаних результатів. Система фізіолого-біохімічних показників білково-нуклеїнового та ліпідного обміну у тканинах коропа і щуки об'єктивно відображає стан водних організмів та якість водного середовища. Одержані дані можуть бути використані для розробки експрес-методів виявлення біологічних ушкоджень у риб іонами металів за зміною білкового та ліпідного складу клітин їх тканин, гематологічних показників та показників перекисного окиснення ліпідів. Отримані результати можуть слугувати при розробці методів оцінки забруднення металами водного середовища у ставковому рибористві.

Результати досліджень можуть використовуватися при викладанні навчальних дисциплін «Водна токсикологія», «Екологічна фізіологія і біохімія», «Експериментальна екологія», «Екологічний моніторинг» для студентів вузів природничих спеціальностей.

Особистий внесок здобувача. Автор самостійно проаналізовано фахову літературу з даної тематики, власноручно виконано експериментальну частину дисертаційної роботи, проведено статистичну обробку результатів. З допомогою наукового керівника здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, сформульовані висновки і запропоновані рекомендації за результатами проведених досліджень. Друковані праці підготовлені безпосередньо автором з наступним обговоренням зі співавторами.

Апробація результатів роботи. Результати досліджень апробовано на: науково-практичній конференції, присвяченій 75-річчю ТНПУ ім. В. Гнатюка та хіміко-біологічного факультету «Концепція сталого розвитку та її реалізація в освіті» (Тернопіль, 2015), IX Міжнародній іхтіологічній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми теоретичної і практичної іхтіології» (Одеса, 2016), Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії», присвяченій до 100-річчя від Дня народження професора Б.Ф. Сухомлинова (Львів, 2016), Науково-практичній конференції «Біологічні дослідження – 2017» (Житомир, 2017), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Тернопільські біологічні читання — Ternopil bioscience – 2017» (Тернопіль, 2017), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Тернопільські біологічні читання — Ternopil bioscience – 2018» (Тернопіль, 2018), XI Міжнародній іхтіологічній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми теоретичної та практичної іхтіології» (Львів, 2018), V Міжнародній науково-практичній конференції «Розвиток сучасної освіти і науки: результати, проблеми, перспективи» (Конін – Ужгород – Херсон – Кривий Ріг, 2018).

Публікації. Результати проведених наукових досліджень опубліковано в 9 статтях у наукових фахових журналах, 9 матеріалах наукових з'їздів, симпозіумів і конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду фахової літератури, матеріалів та методів дослідження, отриманих результатів та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел (271 найменування з них 188 латиницею). Роботу викладено на 162 сторінках комп'ютерного набору та ілюстровано 47 рисунками і 9 таблицями.

РОЗДІЛ І. ФЕРУМ У ГІДРОЕКОСИСТЕМАХ, ЙОГО БІОЛОГІЧНА РОЛЬ, ТОКСИЧНІСТЬ ТА МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ

1.1. Форми знаходження Феруму в природних водах

Форми існування металу в гідроекосистемах детермінуються впливом багатьох чинників і процесів, які визначають надходження [81, 141], концентрацію і просторово-часовий розподіл металів у водних об'єктах [19, 56].

Ці процеси можна розділити на фізичні (розведення, випаровування, осідання), хімічні (комплексоутворення, гідроліз) та біологічні (сорбція).

Фізичні форми міграції металів у водному об'єкті можна класифікувати за їх агрегатним станом [45]:

- Грубодисперсні (зважені форми, що включають органічні і неорганічні сполуки металів, сорбованих на зважених речовинах або входять до його складу, хімічно пов'язані з ним);
- Дрібнодисперсні (колоїдні форми – проміжні форми між розчиненою і зваженою формами), які утворюють з грубодисперсними формами гетерогенні системи;
- Істинно розчинені форми, що утворюють гомогенні системи.

Внаслідок складного хімічного складу природних вод, присутності мінеральних і органічних компонентів у кожному з агрегатних станів іони металів можуть перебувати у вигляді різноманітних хімічних сполук, які будуть впливати на міграційну здатність металів [14].

Отже, в поверхневих водах важкі метали присутні у вигляді ряду форм: розчиненої, адсорбованої на суспендованих у воді мінеральних та мінерально-органічних частинках, клітини фіто- і зоопланктону, у вигляді колоїдів, простих і складних гідратованих катіонів та аніонів, гідроксокомплексів, низько- і високомолекулярних комплексних сполук з неорганічними і органічними лігандами різної структури і стійкості, в

акумульованому гідробіонтами і утримуваному донними відкладеннями сполук [52].

Вміст Феруму у земній корі складає 4,65 % за масою, проте через невисоку лабільність металу його концентрація в гідроекосистемах незначна, і його відносять до мікроелементів [267].

Основним джерелом підвищених концентрацій Fe у водному середовищі є процеси вивітрювання гірських порід, вилуговування Феруму із шахтних звалищ, промислові стоки [100, 158].

Залізо (Fe) виявлено в концентраціях від $\text{нг}\cdot\text{дм}^{-3}$ в морському середовищі [216] до $\text{мг}\cdot\text{дм}^{-3}$ в прісноводних екосистемах, що забрудненні шахтними водами [266]. Ферум існує у воді в різних ступенях окиснення залежно від чинників навколишнього середовища. Двовалентний ферум [Fe (II)] більш розчинний, ніж його трьохвалентна форма [Fe (III)]. Fe (III) утворює слабкі зв'язки з комплексоутворюючими агентами і, як правило, більш біодоступний еукаріотам [245].

Співвідношення між формами Феруму у природних водах залежить від температури, величини рН, наявності хелатуючих агентів і вмісту кисню [140].

Так, за нейтральних рН і в добре аерованих водоймах, Fe (III) є більш термодинамічно стабільним і Fe (II) може становити всього 0,2-0,7% Fe від його загальної кількості у верхніх шарах водойми [184]. Напіврозпад Fe (II) може бути від декількох секунд в збагачених киснем лужних умовах [210], до декількох годин за низьких значень окисно-відновного потенціалу та рН [253].

Ферум може зустрічатися в природних водах у наступних видах: істинний розчин (двовалентний Ферум, прозора безбарвна вода), нерозчинна форма (тривалентний Ферум, прозора вода з коричнево-бурим осадом або яскраво вираженими пластівцями), у вигляді колоїдів (неорганічних Fe (OH)₃, Fe(OH)₂, FeS – і органічних), у вигляді комплексних сполук (головним чином, органічних) і у вигляді

тонкодисперсної суспензії ($\text{Fe}(\text{OH})_3$, $\text{Fe}(\text{OH})_2$, FeS , забарвлена жовтувато-коричнева вода, осад не випадає навіть при тривалому відстоюванні) [45].

Переважає більшість Fe (III) у воді утворює нерозчинні оксиди, гідроксиди та гідроксооксиди Феруму, які випадають в осад з розчину. На швидкість окислення Fe^{2+} в природних водах впливає наявність гумінових і фульвокислот, а також величина pH. Нерозчинні оксиди та гідроксиди осідають на дно, що значно обмежує їх доступність для гідробіонтів.

Утворений при окисленні $\text{Fe}(\text{OH})_3$ дуже мало розчинний (при pH = 4 – близько $0,05 \text{ мг/дм}^3$, а при більш високих – тисячні частки мг), але може бути присутнім у розчині в колоїдному стані, в якому, мабуть, і є однією з основних форм існування заліза в поверхневих водах. Стійкість колоїдного заліза значно підвищується захисною дією присутніх у воді гумусових речовин. Випадання заліза в осад з цього комплексу відбувається за участю бактерій, що руйнують органічну речовину [147, 148].

За участю бентосу та сприятливих окисно-відновних умов може проходити перетворення Fe (III) в Fe (II), який потім може дифундувати в товщі води [245].

У відповідь на низькі концентрації Fe (III) деякі бактерії та фітопланктон можуть виділяти низькомолекулярні сполуки, так звані сідерофори, які мають високу спорідненість до Fe (III) [262]. Це збільшує концентрацію біодоступних ферумвмісних комплексів у воді [106, 129]. Гідробіонти, які секретують сідерофори, можуть поглинати Ферум за допомогою спеціалізованої Fe (III) – сідерофорної системи.

Інші мікроорганізми мають мембранні Ферум-хелат редуктази, що ефективно зв'язують Fe (III) у комплекс відновлюючи Fe (III) до Fe (II), який стає доступний для поглинання [267].

У більшості прісноводних водойм важливу роль щодо мобільності, розчинності та біодоступності мікоелементів відіграють розчинні органічні речовини (РОР), наприклад гумінові та фульвокислоти [179].

Зовнішні фактори, такі як сонячне світло, особливо, ультрафіолетове випромінювання, з участю сідерофорів чи гумінових кислот можуть ініціювати процес відновлення Fe (III) до Fe (II) як в морських, так і прісноводних акваторіях [216].

Разом з тим, основними формами міграції заліза в поверхневих прісних водах є суспендовані і колоїдні форми, що досягають 95–97% валового його вмісту в річкових водах і на 10–30% менше у водах озер і водосховищ [45].

Незважаючи на досить високий вміст розчиненого заліза в поверхневих прісних водах, основна частина його мігрує у складі суспензій, причому найбільше зважена форма Феруму характерна для річкових вод (до 98,5% валового його вмісту). Встановлено, що річки світу щорічно виносять у середньому близько $9,6 \cdot 10^8$ т заліза [45].

У водах озер і водосховищ концентрація Феруму зазвичай вище, ніж у річках. Його концентрація схильна до сезонних коливань. Це обумовлено впливом наступних чинників: рН, Eh води, вмістом розчиненого кисню, двоокису вуглецю, сірководню, органічних речовин, мікрофлорою водойми, уповільненням стоку, інтенсивністю ґрунтового живлення [188].

1.2. Методи аналізу та контролю Феруму в гідроекосистемах

В Україні прісноводні екосистеми функціонують в режимі високих антропогенних навантажень [24]. У різних за походженням та цільовим призначенням водоймах об'єднано діють сапробні та токсичні агенти, у тому числі й метали [45]. Зміни гідрохімічного режиму часто призводять до зниження біопродуктивності водойм, порушення функціонування метаболічних систем гідробіонтів.

Тому за вмістом металів та їх сполук у природних водах, особливо у водоймах питного та рибогосподарського призначення, необхідно постійно проводити екоаналітичний контроль, оскільки їх концентрації в природних водах нерідко виявляються близькими до ГДК. Невисокі допорогові

концентрації металів у воді часто призводять до хронічного отруєння водних організмів. Ускладнюється оцінка вмісту металів у воді, включно Феруму, через велику різноманітність його форм, що, в свою чергу, передбачає специфічність прийомів відбору, консервування та зберігання проб для аналізу.

Хіміко-аналітичний аспект проблеми визначення форм існування металів у природних водах хоча й був сформульований близько 20 років тому, проте лише з появою новітніх методів аналізу ця задача стала доступною для вирішення [11].

За екоаналітичного контролю водних об'єктів необхідно приділяти велику увагу питанням відбору репрезентативної проби та інтерпретації отриманих результатів. Загальні принципи відбору проб, для визначення вмісту металів, зводяться до наступних положень:

1. Відібрана проба повинна бути репрезентативною, тобто типовою для всього досліджуваного об'єкта;
2. Відбір проби, зберігання, транспортування і робота з нею повинні проводитися так, щоб не відбулося змін у вмісті визначених компонентів або у властивостях води від моменту відбору проби до її аналізу;
3. Вибір способу консервування проби і її об'єм повинні проводитися з урахуванням використовуваного методу лабораторного аналізу;
4. Всі умови відбору проби повинні чітко документуватися [55, 58].

Найчастіше для визначення у воді металів використовують такі аналітичні методи: атомно-абсорбційна спектрометрія (ААС) з полум'яним детектором, атомно-абсорбційна спектрометрія в графітовій печі, атомно-емісійна спектроскопія з індуктивно зв'язаною плазмою (ICP-AES), мас-спектрометрія з індуктивно зв'язаною плазмою (ICP-MS) [170, 189, 257].

Методика ICP-AES характеризується найвищою чутливістю (менше 0,02 мкг/дм³). Методи ААС володіють дещо нижчою чутливістю та

точністю (20 мкг/дм^3). Межі виявлення металів для інших методів знаходяться в діапазоні від $0,7$ до 3 мкг/дм^3 .

Вміст металів можна визначати з меншою точністю і чутливістю, використовуючи колориметричні методи [167]. Часто фотометричні методи доцільніше використовувати на практиці у випадках, де не потрібна висока чутливість визначень з огляду їх відносної простоти у виконанні та невисокої вартості [258].

Серед електрохімічних методів найчастіше використовують іонселективні електроди, потенціометрію, інверсійну вольтамперометрію (ASV) [181].

Перераховані методики дозволяють кількісно визначати лише валовий вміст металу, але не забезпечуть визначення багатогранності хімічних форм та видів металів у воді. Для розділення різних форм металів вищевказані методики комбінують з техніками відокремлення та концентрування, такими як екстракція, іонселективна, рідинна, газова хроматографія, електрохімічні методи і т.д. [107].

При визначенні загального вмісту металів у природних і стічних водах, що містять значну кількість комплексоутворюючих речовин, органічних сполук, у ряді методик передбачається попередня пробопідготовка. Найчастіше використовують мокре озолення, яке включає 20 хв кип'ятіння проби з HCl і $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ або обробку проби за кип'ятіння з сумішшю концентрованих сульфатної та нітратної кислот з подальшим випаровуванням до парів сульфатної кислоти [4].

Порівняно недавно в Україні в якості національного, був прийнятий міжнародний стандарт визначення ряду елементів, включно Феруму та Купруму [21].

Метод базується на вимірюванні інтенсивності випромінювання атомів визначуваних елементів, що виникає при розпиленні аналізованої проби в індуктивно збудженій радіочастотним електромагнітним полем аргонівій плазмі.

Визначення загальної кількості елементів проводять наступним чином. Пробу відразу після відбору (або під час відбору) підкислюють нітратною кислотою до $\text{pH} = 2$. Пробу не фільтрують. Аналіз проводять як можна швидше. Якщо утворився осад, його розчиняють додаванням кислоти при нагріванні. Холосту пробу обробляють аналогічно. Для визначення розчинених елементів пробу води фільтрують через мембранний фільтр з порами 0,45 мкм. Фільтрат підкислюють 1 мл концентрованої нітратної кислоти до значення $\text{pH} < 2$.

При визначенні елементів, що знаходяться в суспензованому стані вимірний об'єм незаконсервованої проби фільтрують через мембранний фільтр відразу після відбору. Фільтр з частинками переносять в контейнер для зберігання і транспортування. Далі мембранний фільтр поміщають в скляний стакан, додають 4 мл нітратної кислоти. Стакан закривають годинниковим склом і обережно нагрівають до повного розчинення осаду на фільтрі. Коли кислота майже випаровується, стакан охолоджують. Потім додають 3 мл нітратної кислоти і знову упарюють пробу. Після охолодження в пробу додають 10 мл хлоридної кислоти і 15 мл води і акуратно розчиняють осад при обережному нагріванні. Пробу охолоджують, годинникове скло і стінки склянки промивають водою. Фільтрують для видалення твердих часток і розбавляють залежно від концентрації визначуваних елементів. Визначення виконують за методом калібрувального графіка.

Досить часто в національних і міжнародних стандартах представлена атомно-абсорбційна спектроскопія [33, 170]. Наприклад, ІСО 8288 встановлює три методи визначення металів у воді атомно-полум'яною абсорбційною спектрометрією: метод А – пряме визначення; метод В – визначення після екстракційного вилучення хелатів аналізованих металів з 1-пірролідіндітіокарбаматом амонію метилізобутилкетонем; метод С – визначення після екстракційного вилучення хелатів аналізованих металів при $\text{pH} \ 2-4$ з гексаметиленамонієм-гексаметилендітіокарбаматом

сумішшю розчинників діізопропілкетон-ксилол. Метод А застосовують, коли концентрації аналізованих елементів порівняно великі і немає заважаючих чинників. Коли проби мають складну невідому природу або містять високі концентрації розчинених мінеральних речовин, застосовують методи В, С.

Отже, на сьогодні велика кількість новітніх методів аналізу забезпечує визначення різних форм металів у поверхневих водах з високою чутливістю та точністю (в окремих техніках межі визначення 10^{-15} г) [11].

Проте, не зважаючи на це, часто аналітичні визначення не дають повного уявлення про якість води, особливо у водоймах рибогосподарського призначення. Це обумовлено тим, що ці методики не завжди дозволяють оцінити біологічну небезпеку води для гідробіонтів [10].

Відомо, що токсичність металів у воді залежить від низки чинників: температури, рН середовища, іонної сили розчину, вмісту кисню, присутності хелатуючих агентів, характеру живлення організму та ін. [61]. Тому перспективнішими та інформативнішими для оцінки токсичності середовища і якості води є методи біоіндикації та біотестування, які часто доповнюють фізико-хімічні методи аналізу металів.

Для біоіндикації якості вод можуть бути використані практично всі групи організмів, що населяють водойми: водорості, макрофіти, планктонні і бентосні безхребетні, хребетні тварини [9]. Кожна з груп гідробіонтів, виступаючи в ролі біологічного індикатора, має свої переваги і недоліки, які й визначають межі її використання для оцінки забруднення середовища металами [8].

Отже, в цілому для ефективного контролю якості об'єктів водного середовища актуальним і необхідним є розробка комплексних, інтегральних методик з використанням фізико-хімічних та біологічних методів.

1.3. Трансформація та токсичність Феруму для гідробіонтів

Ряд металів (Cu, Zn, Fe, Mn, Mo, Ni, Co, Se, Cr, V) є життєво необхідними для гідробіонтів, у тому числі і риб. Більше третини всіх білків, як вважають, вимагають металу-кофактора для нормального функціонування [228].

Металопротейни здатні виконувати широкий спектр біологічних функцій: ферментативних, транспортних, медіаторних та ін. У металопротейнах метали -мікроелементи є найважливішими компонентами, що стабілізують структуру білка або входять в активний сайт ферменту [270].

Чи не найважливішими за біологічним значенням з переліку металів є Ферум, адже метал входить до складу гемоглобіну та за його участю функціонують ферменти ланцюга транспорту електронів, який є основою аеробного життя [267].

Широкий спектр природних і антропогенних джерел обумовлює надходження Феруму у навколишнє середовище. Метали не піддаються біологічному розпаду і як тільки вони потрапляють у навколишнє водне середовище відбувається їх біосорбція з можливим подальшим акумулюванням у структурних компонентах організму гідробіонтів [113, 265].

Біоконцентрування здійснюється за низьких концентрацій і є важливим з екологічної точки зору. Нестача есенціальних металів може викликати низку захворювань або призводити до смерті. Однак біонакопичення може становити потенційну небезпеку навіть за незначного зростання концентрації металу у воді. Це пов'язано з тим, що біологічна функція металів у організмі риб здійснюється за досить низьких концентрацій, а надмірне їх акумулювання може призводити до хронічного чи гострого отруєння [267].

Біонакопичення металів залежить від еволюційних та екологічних характеристик гідробіонтів, способу їх існування та живлення, фізико-хімічних параметрів водного середовища. Шкодочинна дія підвищених концентрацій металів у тому числі і біогенних, може прослідковуватися на молекулярному, клітинному, тканинному та організменному рівнях організації [241].

Тому, дуже важливим є питання як організм риб підтримує життєво необхідні кількості металів за їх різних концентрацій у воді.

Якщо метал має важливе біологічне значення для риб, то крива концентрація-реакція для здоров'я (або доза-ефект) повинна мати форму дзвону: симптоми дефіциту відмічаються за низьких концентрацій, токсичність при високих концентраціях, а плато між ними – фізіологічний оптимум (рис. 1.1).

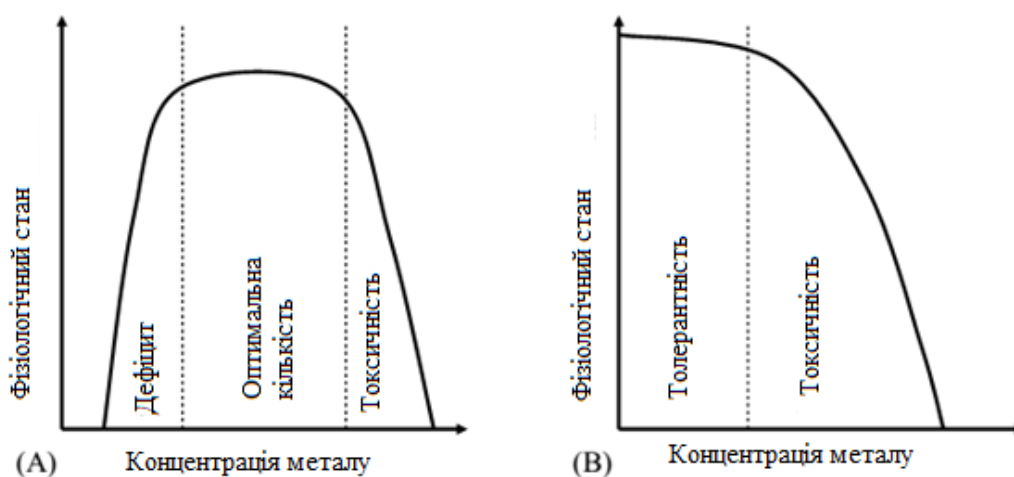


Рис. 1.1. Схеми залежності концентрація металу-здоров'я риб для есенціальних (а) і неесенціальних (б) металів. За моделлю Charman and Wang (2000) [115].

Однак, якщо метал неесенціальний, то у цьому випадку буде тільки плато толерантності – діапазон, де фізіологічний стан організму нормальний, а механізми екскреції або детоксикації відбуваються синхронно з надходженням. Вище цього концентраційного діапазону буде відмічатися токсичний ефект [115].

Ступінь і направленість фізіологічних порушень в організмі риб будуть залежати від біоконцентрації поглинутого металу, що, у свою чергу, визначається фізичними і хімічними характеристиками навколишнього середовища. Як правило, негативний вплив на водну екосистему пов'язаний з дією не одного металу, а їх суміші [256]. Підвищені концентрації сумішей металів у водних екосистемах можуть проявляти як синергетичний, так і антагоністичний ефекти [202].

Основними чинниками, які впливають на токсичність металів є:

- види (форми) металів у воді;
- наявність інших металів або забруднюючих речовин;
- абіотичні фактори (температура, рН, розчинений кисень, твердість тощо);
- біотичні чинники (вік, розміри, стать, філогенетичне (еволюційне) положення, адаптивні можливості, поведінка гідробіонтів) [100].

1.3.1. Біологічна роль та метаболізм Феруму в організмі тварин

Залізо є необхідним металом для життя тварин в середовищі, багатому киснем. Ферум входить до складу низки гемових (гемоглобін, мітохондріальні та мікросомальні цитохроми, каталаза та ін.) та негемових (трансферин, феритин, мітоферин тощо) білків та відіграє важливу роль в окисно-відновних процесах клітини [267].

Потреби риб у Ферумі можуть значно варіювати залежно від видових особливостей риб, проте вони значно нижчі порівняно із ссавцями [233, 263].

Біоконцентрування заліза представляє значний ризик для здоров'я популяцій риб. Так, відмічено в м'якій воді швидке накопичення Феруму (протягом 2 год) в зябрах данію з подальшим тканинним розподілом. Екскреція відбувається також досить швидко: $>50\%$ ^{59}Fe протягом 24 год [112].

В роботі [153] показано акумулювання Феруму в печінці коропа за довгострокового впливу Fe у концентрації 1мг/дм^3 .

Слід відзначити, що доступність металів для риб у товщі води визначається концентрацією металів або найпростіших комплексів з неорганічними іонами. Присутність інших комплексоутворюючих речовин, насамперед органічних, знижує поглинання та захищає рибу від підвищених концентрацій металів [227].

Проте в роботі [118] було показано, що комплекси Феруму з гуміновими кислотами є легкодоступними для поглинання зябрами прісноводних риб.

Тканинні концентрації Fe змінюються в широких межах залежно від виду риб та сезону [267]. Зважаючи на важливе значення заліза для метаболізму (першочергово функція гемоглобіну), його рівень у риб досить високий і в середньому складає міліграми на кілограм вологої тканини [139]. Вміст Феруму суттєво варіює залежно від виду тканин: вищим він є у печінці та зябрах (сотні міліграм Fe на кілограм), нижчим у м'язах (десятки міліграм Fe на кілограм) [264, 267].

Поглинання Феруму у риб є жорстко регульованим високоефективним процесом на відміну від екскреції металу [232]. Поглинання і метаболізм заліза в риб вичені недостатньо, проте вони мають багато спільного з іншими хребетними [263].

У риб зябра, шлунково-кишковий тракт і поверхня тіла – основні структури, що беруть участь у поглинанні металів [234].

Більша частина металів поглинається двома основними шляхами: через зябра та шлунково-кишковий тракт риб, між якими існує чітка взаємодія (рис.1.2).

Кількість поглинутого заліза через зябра значно менша, ніж через кишечник, що дозволяє припустити, що шлунково-кишковий тракт відіграє домінуючу роль у поглинанні Fe [119].

У раціоні риб та ссавців Fe може бути представлений як в гемовій, так і негемовій формі. Більшість досліджень поглинання Феруму присвячено поглинанню негемової форми металу. На сьогодні існує дискусія з приводу наявності та функціонування кишкового транспортера гемового заліза у тварин [163].

Проте у періоди, коли з їжею надходить недостатня кількість Fe, роль надходження Феруму через зябра зростає. Так, райдужна форель потенційно може поглинати близько 85% Fe через зябра від щоденно рекомендованої норми [118].

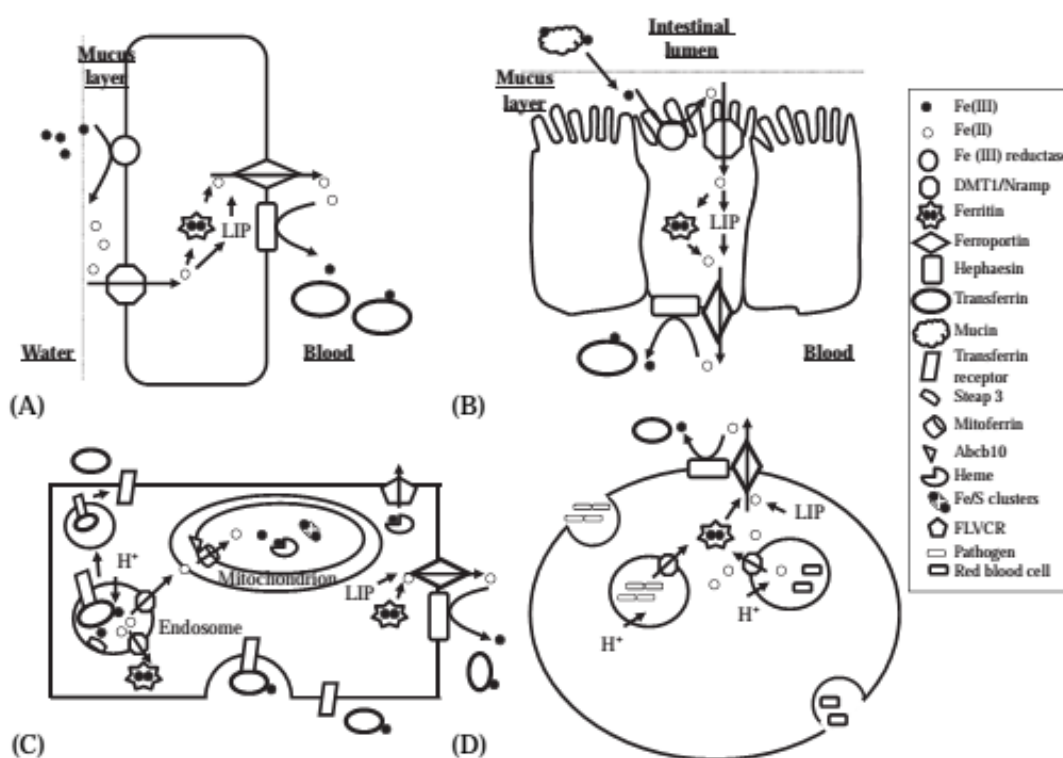


Рис. 1.2. Механізми поглинання та внутрішньоклітинного транспорту Феруму (Fe) у риб; (A) – клітина зябер; (B) – ентероцит; (C) – клітина внутрішніх тканин; (D) – макрофаг [267].

В зябрах риб (рис. 1.2. (A)) сполуки Феруму (III) зв'язуються із слизом і проникають до апікальної мембрани клітин зябер, де відновлюються за допомогою мембранозв'язаної Fe (III) редуктази, аналогічної з ссавцями, чи зовнішніх відновників (наприклад аскорбату) до Fe (II) [114].

Слід відзначити, що Fe (II) є більш біодоступним для зябрового поглинання, ніж Fe (III) [118].

Fe (II) є субстратом для $\text{Fe}^{2+}/\text{H}^{+}$ симпортера – транспортного білка двовалентних металів 1 (DMT1) [178].

Після того як Fe потрапляє до клітин зябер він зв'язується феритином або поповнює пул незв'язаного Феруму (LIP). Експорт Fe (II) відбувається через трансмембранний транспортний білок ферропортин [85]. Ферропортин пов'язаний з мембранною феррооксидазою гефестином, що, в свою чергу, окислює Fe (II) до Fe (III) [161]. Гомологи гефестину ще не повністю вивчені у риб. Fe (III) зв'язується з трансферином плазми крові і циркулює в організмі риб [267].

В кишечнику риб Fe (III) зв'язується з муцином, зберігаючи розчинність у шлунково-кишковому тракті (рис. 1.2. (Б)). У дванадцятипалій кишці, комплекс муцин-Fe (III) проникає крізь слизову оболонку епітелію кишечника [220]. Після цього етапу процес поглинання Феруму подібний до зябрових клітин [267].

Fe (III) – трансферин з током крові переноситься до інших тканин, де зв'язується на поверхні клітинної мембрани з рецептором трансферину після чого проникає в клітину шляхом ендоцитозу (рис. 1.2. (С)). Протонний насос збільшує внутрішню кислотність в ендосомі та забезпечує вивільнення Fe-трансферину від його рецептора і Fe (III) від трансферину. Локалізована всередині ендосоми Fe (III) редуктаза (так звана Stear 3), відновлює Fe (III) до Fe (II). Fe (II) виводиться з ендосом за допомогою DMT1. Рецептор трансферину та апо-трансферин повторно рециркулюють [93, 247].

Після цього цитозольний Ферум у незв'язаному вигляді чи у вигляді комплексу з феритином транспортується у мітохондрії або експортується з клітини з допомогою ферропортину.

У всіх клітинах Fe транспортується до мітохондрій, де це необхідно для забезпечення синтезу гема і Fe/S кластерних білків, а в еритроїдних

тканинах відбувається синтез гемоглобіну. У костистих риб, синтез гемоглобіну, як правило, проходить в ретикуло-ендотеліальних клітинах строми селезінки та в нирках [89].

Не зовсім зрозуміло як Fe транспортується через зовнішню мембрану мітохондрій. Внутрішню мембрану мітохондрій він перетинає за допомогою мітоферину [199]. Процес проходить за участі АТФ-зв'язаного касетного транспортера (транспортного білка) Abcb10, який взаємодіє з мітоферином та полегшує імпорт Феруму в мітохондрію [86]. Fe (II) доставляється до ферменту феррохелатази, де він окислюється і включається до гему або Fe/S кластерних протеїнів [94, 116].

Гем експортується з клітини за допомогою специфічного транспортного білка – підгрупа с рецептора віруса котячої лейкемії (FLVCR) [173].

Макрофаги клітин беруть участь в утилізації Fe від старіючих еритроцитів і захисті від патогенних мікроорганізмів (рис. 1.2. (D)). Старіючі еритроцити поглинаються макрофагами. Протонний насос знижує значення рН, що забезпечує руйнування еритроцитів лізосомальними ферментами, а Ферум вивільняється внаслідок утилізації (руйнування) гему гемоксигеназою 1 [219].

На сьогодні вважають, що Fe (II)/H⁺ транспортери риб є симпортерами, функціонування яких забезпечує ефективне експортування Fe (II) з лізосоми шляхом збільшення у ній концентрації H⁺ іонів [108, 124].

Вивільнений Ферум зв'язується феритином (або у незв'язаній формі) та виводиться з макрофага через ферропортин у кров, де зв'язується трансферином [169].

Дуже незначна кількість Феруму в організмі риб знаходиться у незв'язаній формі. Як правило, зберігання і транспортування металу здійснюється у вигляді складних металопротеїнових комплексів.

Аналіз літератури показує, що молекулярні характеристики Ферумвмісних білків риб демонструють тісний зв'язок з металопротеїнами ссавців [267].

Найважливішими Ферумвмісними протеїнами, що забезпечують депонування та транспорт Феруму є феритин та трансферин [267].

Трансферин (TF) являє собою глікопротеїн, що включає приблизно 690 амінокислот, дуже ефективно зв'язує Fe (III) і транспортує Ферум з током крові до внутрішніх органів. Синтезується в основному в печінці тварин [244]. Гомологи до людського трансферину були знайдені у великій кількості видів риб [243].

Поглинання Fe-трансферинового комплексу (Fe-TF) із сироватки до клітин органів відбувається через рецептор трансферину [247].

Феритин. Основний білок внутрішньоклітинного зберігання Fe в розчинній біодоступній нетоксичній формі з молекулярною масою 450 кДа. Протеїн складається з 24 субодиниць, які утворюють чотири спіральні пучки, щоб сформувати сферичну оболонку, всередині якої може зберігатися 4500 атомів Fe [96].

Незважаючи на те, що Fe може вивільнятися з епітеліальних клітин за допомогою ферропортину, на сьогодні вважають, що у риб не існує механізмів регуляції екскреції Fe з організму [200]. Контроль за кількістю Феруму в організмі тварин здійснюється за рахунок жорсткої регуляції поглинання Феруму в зябрах та кишечнику. Лише невеликі кількості Fe можуть бути виведені за допомогою печінки (через жовчні протоки) [104] і нирок [168].

В окремих випадках виведення Феруму може відбуватися внаслідок злущування епітелію в кишечнику риб. Так, у *Gulf toadfish* Перської затоки, після початкового етапу накопичення Fe у кишковому епітелії риб (приблизно 120 хв), поглинання сповільнюється і залишається постійним протягом 60 хв. Згодом концентрація Fe знову зростає. Очевидно, повільна стадія накопичення обумовлена злущенням епітелію [119].

Основним регулятором поглинання і розподілу Fe у всіх органах риб є пептид гепцидин – ферум-регулюючий гормон [204]. Ген гепцидину кодує препептид з 84-амінокислотних залишків, який розщеплюється з утворенням активного пептиду, що включає 20-26 амінокислотних залишків [160]. Основним місцем синтезу поліпептиду та його регуляції є печінка, проте можливе його утворення і в інших тканинах, особливо у риб [152].

Гепцидин регулює посттрансляційну експресію ферропортину. Гепцидин зв'язується з ферропортином і викликає його інтерналізацію і деградацію в ендолізосомах, що, у свою чергу, блокує транспорт заліза через ферропортин [160]. Коли кількість заліза є достатньою або надлишковою, підвищена експресія гепцидину гальмує поглинання кишкового заліза, виділення утилізованого заліза з макрофагів і його транспорт через плаценту. З іншого боку, коли запаси заліза низькі, виробництво гепцидину пригнічується. За разунк модюляції експресії гепцидину, організм може контролювати вміст заліза в плазмі та підтримувати гомеостаз метаболізму заліза у тварин в цілому [98, 150].

Отже, гомеостатичне регулювання кількості Феруму в організмі риб відбувається в основному на етапі поглинання. Припускають, що в організмі риб існує Fe-гомеостатична система, яка підтримує постійну концентрацію Феруму в плазмі. Ця система може включати в собі центральні сенсори в межах кровоносної та центральної нервової системи і локальні сенсори усередині клітин тканин-мішеней [119, 150].

1.3.2. Токсична дія Феруму на організм риб

Надлишок заліза в організмі тварин може мати виражений токсичний ефект [155]. Негативна дія металу може мати місце внаслідок надмірного його накопичення через кишечник чи зябра риб або внаслідок порушення метаболізму Феруму в організмі [267].

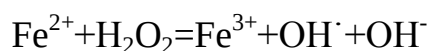
Токсичність заліза у воді тісно пов'язана з його формами, які безпосередньо взаємодіють з граничними епітеліальними структурами риб. Токсичність не просто питання концентрації металу в навколишньому середовищі, але й фізико-хімічні показники води та фізіологічний стан організму риб, які сильно впливають на біодоступність металу. У кислому середовищі і при низьких концентраціях кисню, Fe знаходиться у воді переважно в двовалентному стані. Вважається, що Fe (II) більш доступний і потенційно токсичніший для водних організмів [112]. Проте, в природних водоймах, де Fe (II) переважає (кисле середовище та низький вміст кисню), рідко зустрічається риба.

Проте, сполуки Fe (III) у воді також можуть чинити негативний вплив на риб, насамперед на зябровий апарат. Було показано, що низькомолекулярні форми Fe (III) спричиняють осадження оксидів Fe (III) на зябровій поверхні, злиття зябрових пластин, гіпертрофію епітелію. Це в кінцевому рахунку призводило до серйозних порушень газообміну у риб [248].

Окремі дослідження демонструють порушення іонного гомеостазу у зябрах риб внаслідок дії підвищених концентрацій Феруму [180].

Підвищений вміст Fe в ході запліднення викликав склерозування яєць *Spirinchus lanceolatus*, що призводило до зниження швидкості вилуплення ікри [134].

Токсичність внутрішньоклітинного Fe пов'язана з його здатністю змінювати окисно-відновний статус клітини. Ферум бере участь у реакції Фентона, що супроводжується утворенням гідроксильних радикалів OH $\cdot$:



Гідроксильні радикали володіють високою реакційною здатністю і можуть викликати перекисне окислення мембран ліпідів, пошкоджувати нуклеїнові кислоти та впливати на активність ферментів [132].

Порушення структури і активності макромолекул можуть бути настільки серйозними, що призводять до загибелі клітин та пошкодження тканин [110].

Так, у озерної форелі внаслідок скидання залізогірничих стоків було відмічено окисне пошкодження ДНК, ознаки синдрому білизни (*bleached*) риб, пошкодження та запалення печінки [95, 125].

У дослідженнях [132] було відмічено дозозалежні зміни у активності супероксиддисмутази і вмісту малонового альдегіду в ембріонах *Oryzias latipes* за впливу Феруму. У дорослих риб зазнали гістопатологічних змін зябра і кишечник, а у мозку і печінці змінився антиоксидантний статус [132].

Отже, підвищені концентрації заліза у воді за сприятливих параметрів водного середовища можуть надходити у надлишкових кількостях в організм риб, здійснюючи токсичну дію. Надлишок заліза в організмі риб негативно впливає на обмін речовин через посилення перекисного окиснення ліпідів, особливо за високого вмісту поліненасичених жирних кислот в раціоні, зниження засвоювання фосфору і міді, зменшення вмісту вітаміну А у печінці [83].

Висновки до розділу 1

У природних водоймах Ферум може перебувати у розчинній (гідратовані іони, розчинні комплекси), колоїдній та суспендованій формах. Основна частина металу мігрує у складі суспензій. У водах озер і водосховищ концентрація Феруму зазвичай вище, ніж у річках. Його концентрація схильна до сезонних коливань. Це обумовлено впливом наступних чинників: рН, E_h води, вмістом розчиненого кисню, двоокису вуглецю, сірководню, органічних речовин, мікрофлорою водойми, уповільненням стоку, інтенсивністю ґрунтового живлення.

Регулювання кількості Феруму в організмі риб відбувається в основному на етапі поглинання металу. Припускають, що в організмі риб

існує Fe-гомеостатична система, яка підтримує постійну концентрацію Феруму в плазмі. Ця система може включати в себе центральні сенсори в межах кровоносної та центральної нервової системи і локальні сенсори усередині клітин тканин-мішеней.

Підвищені концентрації заліза у воді за сприяливих параметрів водного середовища можуть надходити у надлишкових кількостях в організм риб, здійснюючи токсичну дію. Це обумовлює необхідність розробки комплексних, інтегральних систем ефективного контролю вмісту Феруму з використанням фізико-хімічних та біологічних методів.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проведено на дворічках коропа (*Cyprinus carpio* L.) і щуки (*Esox lucius* L.) з середньою масою 300-350 г. Дослідних риб виловлювали із ставків Тернопільського рибкомбінату, урочище Залісці. Для експериментального витримування риб використовували відстояну водопровідну воду (Na^+ 18 мг·дм³; K^+ 1 мг·дм³; Cl^- 10 мг·дм³; Ca^{2+} 50 мг·дм³; Mg^{2+} 9 мг·дм³; Fe^{3+} слідові кількості; HCO_3^- 115 мг·дм³; SO_4^{2-} 10 мг·дм³; pH 7,7-7,9). Вміст кисню у воді акваріумів підтримували на рівні 7,0 – 8,0 мг/л. Перед дослідом риб аклімували 3 доби в басейнах об'ємом 2 м³.

В експериментах риб утримували в лабораторних акваріумах об'ємом 200 л з розрахунку 40 дм³ на одну особину. З метою запобігання хронічного впливу на риб їх власних екзометаболітів воду в акваріумах змінювали щодобово.

Вивчали вплив іонів Fe^{3+} на риб в концентраціях 0,2 і 0,5 мг/дм³, що відповідали 2 та 5 рибогосподарським ГДК [53]. Необхідні концентрації іонів металу у воді створювали внесенням солі $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ кваліфікації “х.ч.”.

Риб під час аклімації не годували. Період утримування риб у токсичних умовах становив 14 діб, що є достатнім для формування адаптивної відповіді на дію стрес-фактору [75, 77].

Контролем служили величини досліджуваних показників тканин риб, які перебували у воді акваріумів без додавання іонів Феруму (III).

2.1. Відбір досліджуваних тканин

Риб забивали шляхом декапітації і проводили екстерпацію передньої долі печінки, зябрових дуг, нирок та білих м'язів спини. Всі процедури відбору тканин виконували при 4⁰С. Кров для дослідження гематологічних показників відбирали із серця риб. Голку для взяття крові з метою

запобігання коагуляції попередньо обробляли розчином гепарину. Досліди виконувалась відповідно до правил європейської конвенції про гуманне ставлення до лабораторних тварин та «Загальних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики.

2.2. Дослідження вмісту металів у тканинах риб

Для дослідження вмісту важких металів використовували методику Мур Дж. та Раммамурті С. [48]. Після препарати органів наважки тканин та плазму крові риб спалювали в нітратній кислоті (х.ч.) у співвідношенні 1:5 (маса: об'єм). Вміст Феруму, Мангану та Купруму визначали на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С-115М і виражали в міліграмах на кілограм вологої маси тканин.

2.3. Визначення вмісту нуклеїнових кислот, білків та їх метаболічної активності у тканинах коропа та щуки

Нуклеїнові кислоти в гомогенатах тканин риб визначали спектрофотометрично [78], враховуючи рекомендації авторів [16]. Для обчислення концентрації нуклеїнових кислот використовували формулу та коефіцієнти молярної екстинції фракцій РНК і ДНК при певній довжині хвилі, віднесені до моля фосфору і виражали в мг%Р. Загальний вміст білків у тканинах визначали біуретовим методом [5] з деякими видозмінами [27], а їх кількість у екстрактах нуклеїнових кислот – за методом Лоурі і співавт. [223].

Для визначення метаболічної активності синтезу білків та нуклеїнових кислот у досліджуваних тканинах використовували умовні числа-тести, які були запропоновані авторами [28] і виражають співвідношення кількості нуклеїнових кислот до відповідних білкових фракцій. При цьому були обраховані такі показники: співвідношення РНК: білок цієї фракції ($\times 10^{-3}$), що одержало назву «РНП-число» та співвідношення ДНК: білок цієї фракції ($\times 10^{-3}$), яке було названо «ДНП-

число». На думку дослідників [28] «РНП-число» відображає інтенсивність процесів білкового синтезу, а «ДНП-число» виражає активність синтезу нуклеїнових кислот.

2.4. Дослідження активності аланін- та аспартатамінотрансферази

Активність аланін- та аспартатамінотрансферази (КФ 2.6.1.2 і 2.6.1.1) в гомогенатах риб визначали за методом Пасхіної Т.С. [57]. Інкубаційна суміш містила: 0,01 М калій-фосфатний буфер (pH=7,4); 200 мМ DL-аланіну або DL-аспартату; 0,2 мМ 2-оксоглутарату. Гідразони кетокислоти, що утворилися після інкубації реакційної суміші з розчином 2,4-динітрофенілгідразину, екстрагували водонасиченим толуолом і фотометрували при 420 нм. Активність ферменту виражали в ммоль піровиноградної кислоти/мл·год.

2.5. Дослідження загальних показників крові та вмісту трансферину у плазмі крові риб

Досліджували кількість еритроцитів, гематокрит, рівень гемоглобіну у крові, вміст білка, активність лактатдегідрогенази, вміст Феруму та трансферину у плазмі крові риб.

Підрахунок еритроцитів проводили в камері Горяєва. Гематокритне число (відношення об'єму еритроцитів до загального об'єму крові, виражене у %) визначали за допомогою мікрокапілярів попередньо оброблених розчином гепарину та висушених при кімнатній температурі [73]. Рівень гемоглобіну досліджували гемоглобінціанідним методом [41]. Вміст білка в плазмі крові визначали за Лоурі та співавт. [223].

Плазму крові отримували центрифугуванням охолодженої гепаринізованої крові риб протягом 10 хв при 2500 об./хв.

Активність лактатдегідрогенази (L-лактат: НАД оксидоредуктаза КФ 1.1.1.27) у плазмі крові визначали по швидкості окислення НАДН, яку реєстрували за зменшенням величини оптичної густини при 340 нм. В

кювету наливали інкубаційне середовище, що складалося з 3 мл тріс-НС1 буфера, пірувату і $0,05 \text{ мл } 9 \cdot 10^{-3} \text{ М НАДН}$. Потім додавали 0,1 мл плазми крові (20-40 мкг білка) перемішували і визначали зміну оптичної густини за 1 хв.

Активність ензиму визначали в мкмоль НАДН/хв на 1 мг білка за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V \cdot K}{6,22 \cdot a}, \text{ де}$$

ΔE – середня зміна оптичної густини проби в ході ферментативної реакції за 1 хв;

V – кінцевий об'єм проби в кюветі;

6,22 – коефіцієнт мікромольної екстинції піридинових нуклеотидів при 340 нм [103].

Вміст трансферину у плазмі визначали турбідиметричним методом з використанням набору «Трансферин-турбі» для досліджень *in vitro*. Анти-трансферинові антитіла при змішуванні зі зразками, що містять трансферин, утворюють нерозчинні комплекси. Ці комплекси викликають зміну абсорбції, залежно від концентрації трансферину у зразку, що можна кількісно порівняти з калібратором трансферину. Вміст металу у плазмі крові визначали методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії після спалювання зразків у нітратній кислоті. Насичення трансферину залізом розраховували як відношення концентрації заліза плазми до загальної залізо зв'язуючої здатності трансферину і виражали у відсотках.

2.6. Визначення вмісту ліпідів та їх окремих класів у тканинах досліджуваних риб

Для біохімічного дослідження вмісту ліпідів та їх окремих класів були використані зразки досліджуваних тканин риб. Тканину подрібнювали на холоді в скляних гомогенізаторах з наступним екстрагуванням загальних ліпідів з тканини хлороформ-метаноловою

сумішшю у відношенні 2:1 за методом Фолча [162]. При цьому до однієї масової частини тканини додавали 20 частин екстрагуючої суміші і залишали на 12 год. для екстракції. Неліпідні домішки з екстракту видаляли відмиванням 1% розчином KCl [59]. Кількість загальних ліпідів у тканині визначали ваговим методом після відгонки екстрагуючої суміші [30].

Дослідження вмісту неполярних ліпідів та їх окремих класів.

Розділення неполярних ліпідів на окремі фракції проводили методом висхідної одномірної тонкошарової хроматографії на пластинках «Sorbfil» (Росія). Перед роботою пластинки активували 30 хв при температурі 105⁰С в сушильній шафі. Отриманий хлороформний розчин ліпідів спочатку випарювали насухо, а потім розчиняли у 1 мл хлороформу. Одержані проби ліпідів наносили на пластинку мікродозатором в кількості 24 мкл розчину і повільно поміщали їх в хроматографічні камери. Рухомою фазою служила суміш гексану, диетилового ефіру і льодяної оцтової кислоти у відношенні 70:30:1 [59]. Одержані хроматограми проявляли в камері, насиченій парами йоду. Для ідентифікації окремих фракцій ліпідів використовували специфічні реагенти і очищені стандарти [30]. Виявлено такі класи неполярних ліпідів: триацилгліцероли (ТАГ), дیاцилгліцероли (ДАГ), неестерифіковані жирні кислоти (НЕЖК), холестерол (ХЛ), моноацилгліцероли (МАГ) та фосфоліпіди (ФЛ).

Кількість неполярних ліпідів визначали біхроматним методом [59]. До проби ліпідів додавали 1Н біхромат калію і концентровану сульфатну кислоту. Спалювання ліпідів у досліджуваних зразках проводили при температурі 160-180⁰С. Інтенсивність забарвлення визначали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 615 нм. Вміст окремих класів ліпідів у тканині визначали за калібровочною кривою, побудованою з використанням очищених стандартів.

Вміст фосфоліпідів у тканинах визначали за кількістю неорганічного фосфору за методом Васьковського [261].

Дослідження вмісту фосфоліпідів та їх окремих фракцій.

Розділення фосфоліпідів на окремі фракції проводили методом висхідної одномірної тонкошарової хроматографії на пластинках «Sorbfil». Перед роботою пластинки активували 30 хв при температурі 105⁰ С в сушильній шафі, обробляли 10% спиртовим розчином фосфорномолібденової кислоти і висушували в струмені теплого повітря протягом 10-15 хв.

Для визначення фракцій фосфоліпідів пластинки елюювали у суміші хлороформ-метанол-льодяна оцтова кислота-дистильована вода у співвідношенні 60:30:7:3. Одержані хроматограми проявляли в камері, насиченій парами йоду, для ідентифікації окремих фракцій ліпідів використовували специфічні реагенти і очищені стандарти [30]. Виявлено такі фракції: лізофосфатидилхолін (ЛФХ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилетаноламін (ФЕА), фосфатидилхолін (ФХ), сфінгомієлін (СМ) та фосфатидилінозитол (ФІ), кардіоліпін (КЛ).

Кількість фосфоліпідів визначали за методом Васьковського [261]. Мінералізацію фосфоліпідів проводили при температурі 180⁰С, при додаванні концентрованої хлорної кислоти. Вміст фосфатів визначали спектрофотометрично [70].

2.7. Дослідження процесів перекисного окиснення ліпідів в тканинах риб

Дієнові кон'югати. Для визначення вмісту дієнових кон'югатів до 0,2 мл гомогенату тканини додавали 1,8 мл суміші н-гептану та ізопропілового спирту у співвідношенні 1:1, струшували і залишали в закритих пробірках на 15 хв, після чого центрифугували при 6000 об/хв протягом 10 хв. Супернатант відбирали у пробірки, в які попередньо вносили по 2 краплі води. Одержану гептанову фазу в кількості 0,5 мл змішували з 2,0 мл етанолу і вимірювали абсорбцію при $\lambda = 233$ нм проти контролю, що містив 0,5 мл н-гептану і 2,0 мл етанолу. Концентрацію

дієнових кон'югатів у зразку визначали, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції $103 \text{ мкмоль}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1}$ і виражали в нмоль/г тканини [69].

Гідроперокси́ди ліпідів. Вміст гідропероксидів ліпідів у гомогенаті тканини визначали за методом, принцип якого полягає в осадженні протеїну трихлороцтовою кислотою (ТХО) з наступним внесенням у середовище тіоціанату амонію [1]. До 0,2 мл гомогенату тканини додавали 2,8 мл етанолу та 0,05 мл 50%-го розчину ТХО і струшували протягом 5 хв. Відбирали 1,5 мл супернатанту і до нього додавали 1,2 мл етанолу, 0,02 мл концентрованої HCl , 0,03 мл 1%-го розчину солі Мора в 3%-му розчині HCl , струшували і через 30 с додавали 0,2 мл 20%-го розчину тіоціанату амонію. Абсорбцію вимірювали при $\lambda = 480 \text{ нм}$. Вміст гідропероксидів ліпідів визначали за різницею між дослідним зразком і контролем, в який замість гомогенату тканини додавали відповідну кількість бідистильованої води.

Вміст ТБК-активних ліпідів. Концентрацію ТБК-активних продуктів у гомогенатах тканин вимірювали за допомогою кольорової реакції малонового діальдегіду (МДА) з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) в умовах високої температури і кислого середовища, що приводить до утворення триметинового комплексу, котрий містить одну молекулу МДА і дві молекули ТБК [37]. Для осадження протеїнів до 1 мл гомогенату тканини додавали 4,5 мл 20%-ої фосфорновольфрамової кислоти і осад, що утворився, центрифугували при 2500 об/хв протягом 15 хв. Надосадову рідину зливали, а до осаду додавали 1,0 мл 0,8%-го розчину ТБК і витримували протягом 1 год на водяній бані при температурі 100°C . Після цього пробірки охолоджували і центрифугували протягом 10 хв при 6000 об/хв. В одержаному центрифугаті вимірювали абсорбцію при 535 і 580 нм проти контрольної проби, яка замість гомогенату містила бідистильовану воду. Дворазове вимірювання абсорбції дозволяє виключити поглинання забарвлених комплексів ТБК речовинами неліпідної природи. Концентрацію ТБК-активних продуктів у зразку

виражали в нмоль МДА на грам тканини, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції утвореного комплексу, який дорівнює $0,156 \text{ мкмоль}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1}$.

Активність СОД визначали за методом [22], принцип якого полягає у відновленні нітротетразолію супероксидними радикалами, які утворюються в реакції між феназинметасульфатом і відновленою формою нікотинамідаденіндинуклеотиду (NADH). Утворення нітроформазау, продукту відновлення нітротетразолію, блокується СОД. Для усунення впливу гемоглобіну до 0,2 мл гомогенату тканини додавали 0,5 мл етанолу і 0,3 мл хлороформу, інтенсивно перемішували та центрифугували протягом 15 хв при 7000 об/хв. Далі до 0,1 мл супернатанту додавали 0,1 мл 1мкМ розчину ЕДТА, 0,1 мл 1,8 мкМ розчину феназинметасульфату, 0,1 мл 0,4 мкМ розчину нітротетразолію синього і 0,1 мл 1,0 мМ розчину NADH. Загальний об'єм суміші доводили 0,15 М фосфатним буфером (рН 7,8) до 3,0 мл та інкубували при кімнатній температурі у темному місці впродовж 30 хв, після чого при $\lambda = 540 \text{ нм}$ вимірювали абсорбцію. У контрольний зразок замість гомогенату тканини вносили дистильовану воду. Активність СОД виражали в умовних одиницях на 1 мг протеїну супернатанту.

Активність каталази визначали за допомогою здатності пероксиду водню утворювати із солями молібдену стійкий кольоровий комплекс жовтого забарвлення [38]. Реакцію запускали додаванням 0,1 мл гомогенату тканини до 2 мл 0,03% гідроген пероксиду. У холостий зразок вносили 0,1 мл дистильованої води. Реакцію зупиняли через 10 хв додаванням 1,0 мл 4%-го молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення вимірювали при $\lambda = 410 \text{ нм}$ проти контрольного зразка, у який замість пероксиду водню додавали 2,0 мл дистильованої води. Активність ферменту виражали в нмоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{хв}$ на мг протеїну гомогенату тканини.

Всі одержані дані піддавали статистичній обробці з використанням t-критерію Стюдента для визначення достовірної різниці [43].

РОЗДІЛ III. ОСОБЛИВОСТІ НАКОПИЧЕННЯ ТА РОЗПОДІЛУ ОКРЕМИХ МЕТАЛІВ У ТКАНИНАХ РИБ ЗА УМОВ ПІДВИЩЕНОГО ВМІСТУ ІОНІВ Fe^{3+} У ВОДНОМУ СЕРЕДОВИЩІ

Сполуки металів відграють важливу роль у розвитку всіх живих організмів. В даний час біля 25 хімічних елементів із групи металів є есенціальними, тобто необхідними для нормальної життєдіяльності гідробіонтів, включно риб [12, 47, 267]. Входячи до складу багатьох біомолекул або вступаючи з ними у взаємодію, метали впливають на перебіг багатьох біохімічних процесів [24].

Такий вплив може бути стимулюючим, пригнічуючим або нейтральним, залежно від природи металу, концентрації та форми його існування у організмі риб. Біологічна функція металів здійснюється при досить низьких їх концентраціях. Присутність металів у кількостях, що перевищують необхідний рівень, стає причиною порушення нормального перебігу процесів життєдіяльності. Часто, зростання вмісту важких металів у водному середовищі призводить до надмірного їх акумулювання водними організмами, зокрема рибами [24, 76, 229].

Значний інтерес становлять важкі метали, які широко застосовуються у різних галузях виробничої діяльності людини та є важливими для гідробіонтів. До таких металів відноситься і Ферум. Ферум є необхідним елементом для нормальної життєдіяльності усіх гідробіонтів, включно риб [61].

Ферум, що знаходиться в організмі риб поділяють на дві групи: геміновий та негеміновий Ферум. Перша група включає Ферум хромопротеїдів (дихальні білки – гемоглобін, хлорокруарин, гелікорубін, білок м'язів – міоглобін), а також дихальних ферментів (цитохроми, цитохромоксидази, пероксидази, кетолази). До другої групи входить Ферум низки речовин, які не містять гемоферумпорфіринового комплексу (гемоеретрин) [267].

Біонакопичення феруму здійснюється за низьких концентрацій. Нестача його може викликати низку захворювань або призвести до смерті. Однак біонакопичення може становити потенційну небезпеку навіть при незначному зростанні концентрації металу у воді. Це пов'язане з тим, що біологічна функція металів в організмі риб здійснюється за низьких концентрацій, а надмірне їх акумулювання може призвести до хронічного чи гострого отруєння [267].

Проникнення та накопичення важких металів в організмі риб є багатовекторним процесом і залежить від багатьох зовнішніх та внутрішніх чинників. Молекулярні механізми їх надходження ще недостатньо вивчені. Проте відомо, що основна частина металів потрапляє в організм двома основними шляхами – через шлунково-кишковий тракт та зябра, між якими існує чітка взаємодія щодо регуляції кількості надходження металу в організм [151]. Дані особливості обумовлюють різну спорідненість окремих тканин до того чи іншого металу, а отже і різну здатність до акумулювання. Часто підвищення концентрації у воді одного металу призводить до порушень у поглинанні, зв'язуванні та виведенні іншого [76].

Метаболічно активні тканини (зябра, печінка, нирки та м'язи) володіють високою здатністю до біоаккумуляції і тому можуть використовуватися для оцінки забруднення водного середовища металами [238]. Саме тому ми намагалися з'ясувати як підвищені концентрації іонів Fe^{3+} у воді впливають на біонакопичення Феруму та перерозподіл Мангану і Купруму у окремих тканинах та органах коропа та щуки.

3.1. Накопичення Феруму в окремих тканинах коропа та щуки за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді

Біоаккумуляція будь-якого металу вище його оптимального рівня в організмі викликає, як правило, незворотні фізіолого-біохімічні зміни [196].

Із одержаних даних видно, що найбільший вміст Феруму виявлено в печінці та зябрах як коропа, так і щуки. При цьому значний вміст досліджуваного металу міститься і в нирках щуки (табл. 3.1, 3.2).

Таблиця 3.1.

Вміст Феруму в тканинах коропа (мг/кг сирової тканини, $M \pm m$, $n=5$)

Групи риб	Зябра	Печінка	М'язи	Нирки
Контроль	87,1 $\pm$ 8,2	154,0 $\pm$ 8,1	39,8 $\pm$ 3,1	87,4 $\pm$ 6,6
0,2 мг/дм ³	100,8 $\pm$ 7,8	142,9 $\pm$ 16,5	26,2 $\pm$ 6,7	70,5 $\pm$ 3,4*
0,5 мг/дм ³	132,4 $\pm$ 5,2*	143,4 $\pm$ 12,8	36,5 $\pm$ 2,4	61,7 $\pm$ 6,6*

Примітка: * – тут і далі відмінності порівняно з контролем достовірні ($P < 0,05$).

Зябра риб є органом, який безпосередньо контактує з водним середовищем і через залозистий апарат якого метали шляхом активної фільтрації потрапляють в організм. Існує думка, що основним місцем проходження через залозистий апарат зябер є хлоридні клітини [29]. Проте існує припущення, що деякі важкі метали проникають в клітини зябрового епітелію прісноводних риб через кальцієві канали в апікальній мембрані [249].

Таблиця 3.2.

Вміст Феруму в тканинах щуки (мг/кг сирової тканини, $M \pm m$, $n=5$)

Групи риб	Зябра	Печінка	М'язи	Нирки
Контроль	147,1 $\pm$ 18,8	349,3 $\pm$ 21,0	43,6 $\pm$ 5,2	142,5 $\pm$ 14,5
0,2 мг/дм ³	250,6 $\pm$ 17,0*	384,3 $\pm$ 17,2	62,9 $\pm$ 5,4*	95,88 $\pm$ 15,0*
0,5 мг/дм ³	309,6 $\pm$ 22,1*	339,9 $\pm$ 22,4	33,6 $\pm$ 6,5	136,7 $\pm$ 17,3

В результаті дії підвищених концентрацій іонів Феруму інтенсивність їх адсорбції зябрами змінюється. При цьому спостерігається прямопропорційне зростання акумуляції із зростанням вмісту іонів Феруму у воді від 0,2 до 0,5 мг/дм³. Слід відмітити, що вміст досліджуваного металу в зябрах коропів контрольної групи майже вдвічі нижчий, ніж в зябрах щук цієї ж групи. За дії 0,2 мг/дм³ металу у воді кількість Феруму у

зйбрах коропа зростає на 14,9%, а у щуки на 70,4%. Концентрація металу у воді в кількості 0,5 мг/дм³ веде до зростання цього показника у коропа на 52,0%, а у щуки на 110,4%.

Отже, на першому етапі акумуляції досліджуваного металу проходить досить швидке його поглинання з водного середовища в результаті сорбційних процесів чи іонно-обмінних або хімічних взаємодій з поверхневими структурами. Було показано, що до 70% іонів металів потрапляють в організм риб саме через зйбра [222].

Зовнішня поверхня зйбер містить негативно заряджені групи (ліганди), які ефективно зв'язують позитивно заряджені іони металу [218].

Відмічається підвищена кількість важких металів у зйбрах за умов гострого забруднення важкими металами води. Навпаки, концентрація важких металів вище допустимої межі в печінці та нирках відображає хронічне отруєння важкими метали. Метаболічно активні органи риб експресують різні метал-зв'язуючі білки, такі як металотіонеїни і, як правило, накопичують метали в зазначених органах [99].

Печінка є одним з найбільших залозистих утворень організму, яке бере участь у важливих метаболічних процесах [62]. В цьому органі також відбувається детоксикація цілої низки шкідливих для організму речовин.

Вміст Феруму в печінці щуки контрольної групи риб досить значний. Він в 2,3 рази перевищує його у коропа. За дії іонів Феруму в кількості 0,2 мг/дм³ вміст металу в печінці щуки зростає на 10,0%, а за дії 0,5 мг/дм³ металу у воді знижується майже до контрольної величини. У коропа ж обидві досліджувані концентрації призводять до незначного зниження вмісту металу в цьому органі (біля 7%).

Із сказаного слідує, що печінка риб є органом, який активно депонує біогенні метали, а також бере участь у зв'язуванні їх надлишку. Є дані про те, що в гепатоцитах іони металів, утворюючи комплекси з ферментами, беруть участь в синтезі білків, обміні нуклеїнових кислот та інших біомолекул [62]. У відповідь на надлишкове надходження металів у

організм в печінці риб ініціюється біосинтез металотіонеїнів, в яких іони металів зв'язуються з високомолекулярною фракцією білка [99]. Таким чином печінка риб виконує гомеостатичну функцію і бере активну участь у регуляції водно-сольового обміну в організмі.

На думку багатьох авторів, головним депонуючим органом у риб є скелетні м'язи [42, 76]. В наших дослідженнях виявлено невисокий вміст Феруму в цій тканині. По суті він найнижчий із усіх досліджуваних тканин. Проте, якщо врахувати, що у кісткових риб м'язова тканина становить до 50% маси тіла, то загальний вміст металу у ній може бути досить значним.

Вміст Феруму в м'язах риб контрольних груп у коропа та у щуки майже рівний (39,8 та 43,6 мг на кг сирої тканини відповідно). За дії підвищених концентрацій у воді вміст Феруму у м'язах коропа спочатку знижується на 34,2% (при 0,2 мг/дм³) та зростає практично до величини контрольної групи при 0,5 мг/дм³. У м'язах щуки відмічена дещо інша тенденція зміни цього показника. Так, концентрація металу у воді в кількості 0,2 мг/дм³ викликає зростання вмісту Феруму в м'язовій тканині щуки на 44,3%, а у кількості 0,5 мг/дм³ – веде до зниження цього показника на 22,9%.

Наявність взаємозв'язку між вмістом металу в м'язовій тканині та його концентрації у воді не виключає можливості фізіологічної регуляції розподілу металу в організмі риб. Можливо, така регуляція відбувається не тільки шляхом обмеження депонування металу в м'язах, але й шляхом міжорганного перерозподілу цього елемента [39]. Напевно, саме тому ми не спостерігаємо певної закономірності у зміні досліджуваних показників в м'язовій тканині коропа та щуки.

Дослідження, проведені на значній кількості різних видів риб, показали, що процес накопичення металу в організмі є досить складним процесом, який складається з фаз накопичення, стабілізації та виведення [24]. Саме у останній фазі важлива роль належить ниркам.

В наших дослідженнях ми спостерігали зниження вмісту Феруму в нирках коропа при $0,2 \text{ мг/дм}^3$ на 19,3% та при $0,5 \text{ мг/дм}^3$ на 29,4%. Слід також відмітити, що вміст цього металу в нирках коропа незначний. У риб контрольної групи він такий же як і в зябрах у цієї ж групи риб. При цьому в печінці Феруму майже вдвічі більше, а в м'язах – вдвічі менше, ніж в нирках.

У щуки відмічена дещо інша закономірність зміни досліджуваних показників. Так, концентрація металу у воді в кількості $0,2 \text{ мг/дм}^3$ призводить до зниження вмісту Феруму у нирках на 32,7%, а при $0,5 \text{ мг/дм}^3$ цей показник зростає практично до контрольної величини. Виявлене явище може свідчити про наявність різних механізмів, які регулюють процеси виділення металів з організму риб. Так, було показано, що регулювання гомеостазу металів може здійснюватися як зміною інтенсивності всмоктування металу в шлунково-кишковому тракті, так і шляхом його екскреції у складі сечі та калових мас [24].

Відомо, що у риб не існує специфічних механізмів екскреції Феруму з їх організму, тому підтримання фізіологічно необхідної концентрації металу здійснюється переважно за рахунок обмеження його надходження [130].

Було показано, що 90% перорально або перентерально введеного в організм коропа цинку виводиться через шлунково-кишковий тракт і лише 10% – з сечею [63]. Це дозволило авторам зробити висновок про те, що у підтриманні гомеостазу цинку в організмі прісноводних риб важлива роль належить не ренальним, а екстраренальним механізмам. Можливо сказане впливає і на рівень екскреції Феруму в складі сечі у досліджених нами риб. Якщо у коропа з підвищенням вмісту металу у воді ми спостерігаємо прямопропорційне зниження вмісту Феруму в нирках, то у щуки такої закономірності не відмічено. Виявлене явище може свідчити про те, що у цих двох видів риб функціонують різні механізми підтримання гомеостазу металів у їх організмі.

3.2. Особливості перерозподілу Купруму та Мангану в тканинах коропа та щуки за умов підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді

За умов підвищеної концентрації одного металу у воді може відмічатися його біонакопичення, що, в свою чергу, призводить до зменшення чи збільшення кількості іншого металу в тому чи іншому метаболічно-активному органі. Це обумовлюється складним характером взаємодії між металами в організмі риб. Такі ефекти тканинного та клітинного перерозподілу металів в організмі риб досліджені недостатньо, проте відомо, що вони можуть призводити до серйозних гематологічних, неврологічних та імунологічних порушень [92]. Взаємодія металів може змінити їх токсичний вплив на водних тварин як позитивно, так і негативно [171].

Відомо, що перехідні метали Купрум та Манган є життєво необхідними для усіх тварин, включно риб, які в процесі еволюції виробили складні механізми підтримання їх опимальної кількості в організмі [267].

Проте, дані метали, як і Ферум, володіють складними координаційними та окисно-відновними властивостями і тому за певних умов контрольні гомеостатичні механізми в організмі риб можуть порушуватися, що призводить до порушення систем транспорту, розподілу та зв'язування металів в клітинах та тканинах гідробіонтів [267].

Тому ми намагалися з'ясувати, яким чином підвищені концентрації іонів заліза вплинуть на кількість Купруму та Мангану в тканинах печінки, зябер, м'язів, нирок коропа та щуки.

Аналіз отриманих результатів показав, що за впливу $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Феруму у воді достовірних змін у кількості Мангану та Купруму в досліджуваних тканинах коропа відмічено не було (табл. 3.3). Разом з тим, підвищення концентрації іонів Fe^{3+} до $0,5 \text{ мг/дм}^3$ у зазначений термін призводило до зменшення кількості мангану у тканинах зябер та печінки і

зростання кількості акумульованого металу у нирках коропа. Можна припускати, що Манган та Ферум конкурують за сайти зв'язування у зябровому епітелії риб, на що вказує зростання кількості Феруму у зябрах коропа (див. табл. 3.1). Зовнішня поверхня зябер містить негативно заряджені ділянки (ліганди), які можуть зв'язувати катіони як Феруму, так і Мангану [218].

Антагонізм у накопиченні Мангану відмічається і у тканинах нирок, де поруч із зменшенням кількості Феруму відмічається збільшення вмісту Мангану. Ймовірно, це можна пояснити подібністю у властивостях цих перехідних металів.

Таблиця 3.3.

Вміст Купруму та Мангану у тканинах коропа за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} (мг/кг сирої тканини, $M \pm m$, $n=5$)

Тканина	Зябра		Печінка		М'язи		Нирки	
Метал	Mn	Cu	Mn	Cu	Mn	Cu	Mn	Cu
Контроль	0,78± 0,08	1,20± 0,20	0,50± 0,10	10,53± 0,77	0,49± 0,11	0,75± 0,12	0,60± 0,08	1,70± 0,23
0,2 мг/дм ³	0,80± 0,10	1,18± 0,15	0,65± 0,10	11,88± 1,25	0,58± 0,17	0,93± 0,12	0,50± 0,06	1,83± 0,19
0,5 мг/дм ³	0,40± 0,01*	1,70± 0,11	0,45± 0,05	14,65± 1,33	0,25± 0,05	0,75± 0,05	0,80± 0,08	1,50± 0,13

Вміст Купруму за впливу 0,5 мг/дм³ іонів Fe^{3+} зростав у тканинах зябер та печінки порівняно з контрольною групою риб. Ймовірно, надмірне надходження Феруму в організм коропа призводить до змін у тканинному розподілі за рахунок стимуляції у зябрах та печінці синтезу білків з лігандами, що ефективно зв'язують Купрум [109].

Автори [92] доводять, що підвищені концентрації іонів Zn^{2+} за подібним механізмом забезпечують додаткове біонакопичення Купруму в тканинах зябер райдужної форелі.

Разом з тим, слід відмітити тенденцію до зниження концентрації Купруму у тканинах нирок у даної групи риб порівняно з контролем ($p > 0,05$).

У тканинах щуки розподіл Купруму та Мангану за дії підвищених концентрацій іонів Феруму має інший характер. Нами не було відмічено достовірних змін у вмісті Мангану в тканинах щуки дослідних груп порівняно з контролем (табл. 3.4).

Таблиця 3.4.

Вміст Купруму та Мангану у тканинах щуки за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} (мг/кг сирої тканини, $M \pm m$, $n=5$)

	Зябра		Печінка		М'язи		Нирки	
	Mn	Cu	Mn	Cu	Mn	Cu	Mn	Cu
Контроль	0,12± 0,01	2,00± 0,19	0,11± 0,01	2,77± 0,2	0,10± 0,01	1,61± 0,06	0,27± 0,03	2,42± 0,48
0,2 мг/дм ³	0,21± 0,07	2,21± 0,23	0,17± 0,04	1,14± 0,12*	0,11± 0,02	2,02± 0,23	0,20± 0,04	2,88± 0,33
0,5 мг/дм ³	0,16± 0,03	1,86± 0,18	0,17± 0,04	3,10± 0,20	0,13± 0,03	1,90± 0,22	0,24± 0,05	3,76± 0,40

Проте, дія 0,2 мг/дм³ іонів Феруму (III) призводила до зниження кількості Купруму в печінці та зростання вмісту металу в м'язах та нирках щуки.

Слід зазначити, що дія 0,5 мг/дм³ металу також призводила до зростання вмісту Купруму у м'язах у вище зазначених тканинах.

В цілому слід відзначити, що зміни у перерозподілі Купруму та Мангану у організмі прісноводних риб, викликані підвищеними концентраціями іонів Fe^{3+} , в першу чергу, визначаються видовими особливостями та концентрацією іонів металу у водному середовищі.

Висновки до розділу 3

Накопичення рибами Феруму є активним і регульованим тканинноспецифічним процесом. Інтенсивність цього процесу залежить від концентрації металу у воді, а також від фізіолого-біохімічної активності організму риб. Так, відмічене зростання вмісту Феруму у 1,5 і 2,1 рази у зябрах коропа і щуки відповідно за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} . У нирках коропа мало місце зменшення у 1,4 рази кількості металу за впливу $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} , а у нирках щуки вміст Феруму знижувався в 1,5 рази за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Феруму (III), що підкреслює ключову роль зябер та нирок у регуляції кількості металу в організмі даних видів риб.

Зміни у перерозподілі Купруму та Мангану у тканинах прісноводних риб, викликані підвищеними концентраціями іонів Феруму (III), в першу чергу, визначаються їх видовими особливостями. Так, у коропа за впливу підвищених концентрацій іонів Феруму у воді ($0,5 \text{ мг/дм}^3$) мають місце зміни у розподілі Мангану між печінкою, зябрами та нирками; для Купруму відмічено модуляцію його вмісту у печінці та зябрах риб за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} . У щуки, насамперед, слід відмітити зростання кількості Купруму в тканинах м'язів та нирок за впливу обох концентрацій іонів Феруму (III) та зниження вмісту Купруму за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} . Виявлене явище може свідчити про те, що у цих двох видів риб функціонують різні механізми підтримання гомеостазу металів у їх організмі.

За результатами представленими в розділі 3, опубліковані наступні роботи:

1. Рабченюк О.О., Хоменчук В.О., Ляврін Б.З., Курант В.З. Накопичення феруму в організмі прісноводних риб за його підвищеного вмісту у водному середовищі. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія*. 2017. № 1 (68). С. 96–101.
2. Рабченюк О.О., Хоменчук В.О., Курант В.З. Ферум у водних екосистемах: форми знаходження, біологічне значення та токсичність

для риб. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія*. 2016. № 3–4 (67). С. 107–119.

РОЗДІЛ IV. БІЛКОВО-НУКЛЕЇНОВИЙ ОБМІН В ОРГАНІЗМІ КОРОПА ТА ЩУКИ ЗА ДІЇ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ФЕРУМУ (III) У ВОДІ

В процесі еволюції організм риби виробив багато механізмів біохімічної адаптації різного ступеня складності, які дозволяють йому успішно пристосовуватися до дії різноманітних чинників оточуючого водного середовища. Одним із них є перебудова шляхів білково-нуклеїнового метаболізму. Адже підтримання структурної та функціональної цілісності цих макромолекул є одним із основних принципів біохімічної адаптації організму до специфічних умов середовища [77].

Нуклеїновим кислотам, як відомо, належить головна роль в забезпеченні генетичної програми розвитку живих організмів, в основі якої лежить синтез білків [23]. Саме тому визначення кількості ДНК, РНК, а також білків з різними функціональними властивостями в органах і тканинах прісноводних риб за дії різноманітних чинників середовища їх існування, у тому числі іонів металів, має важливе як теоретичне, так і практичне значення.

Функціонально сполуки металів відіграють важливу роль у життєдіяльності всіх організмів, у тому числі і гідробіонтів. Більше третини всіх білків вимагають металу-кофактора для нормального функціонування [72, 228, 267].

Присутність металів у кількостях, що перевищують необхідний рівень, стає причиною порушення нормального перебігу процесів життєдіяльності. Найбільший інтерес становлять метали, які широко застосовуються у різних галузях виробничої діяльності людини та є важливими для гідробіонтів. Саме до таких металів відноситься залізо [115].

Токсичний ефект, навіть за дії підвищених концентрацій біогенних металів, може проявлятися на усіх рівнях організації живого: молекулярному, клітинному, тканинному, організменному, популяційно-видовому тощо [241]. Виходячи із усього сказаного, метою цього розділу стало вивчення вмісту нуклеїнових кислот і білків, а також визначення їх метаболічної активності в тканинах коропа та щуки за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} .

4.1. Вміст нуклеїнових кислот в тканинах риб за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді

Аналіз отриманих результатів показав, що за 14 діб аклімації риб до підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді (0,2 та 0,5 мг/дм³) в їх тканинах змінюється вміст білків та нуклеїнових кислот, а також порушується обмін цих речовин. Так, зокрема, відмічено збільшення вмісту РНК в печінці коропа на 19,3% за дії 0,2 мг/дм³ і на 13,0% за впливу 0,5 мг/дм³ металу у воді (рис. 4.1). В печінці ж щуки (рис. 4.2) дія іонів Fe^{3+} спричиняла зниження концентрації РНК на 32,1% та 34,4% щодо контролю відповідно. При вивченні вмісту ДНК виявлено зниження цього показника в печінці коропа при обох досліджених концентраціях заліза на 32,0%. В той же час у печінці щуки концентрація ДНК знижувалася на 21,0% при 0,2 мг/дм³ металу у воді та практично не змінювалася при 0,5 мг/дм³.

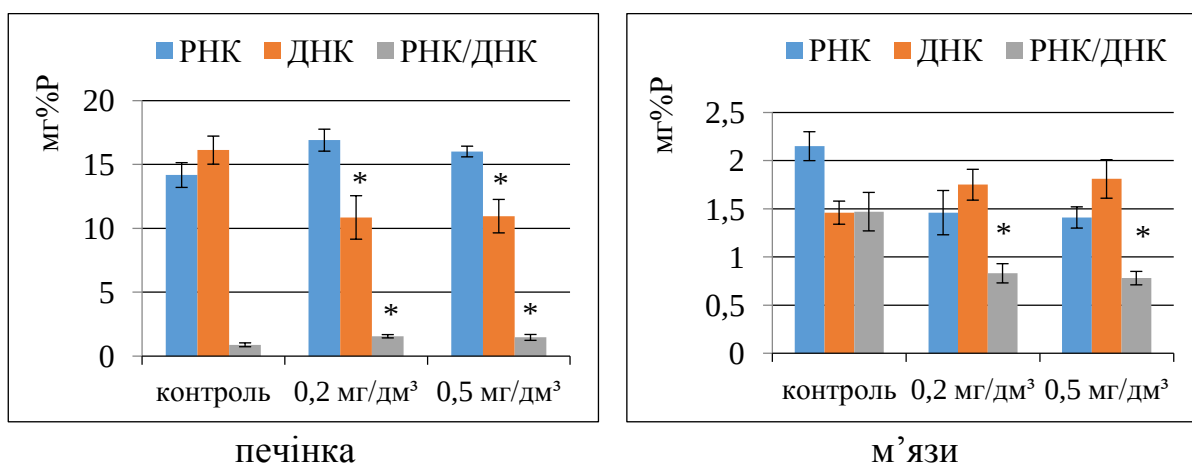


Рис. 4.1. Вплив іонів Fe^{3+} на вміст нуклеїнових кислот у тканинах коропа ($M \pm m$, $n = 5$).

Примітка: * – тут і далі зміни порівняно з контролем достовірні ($P < 0,05$).

Різна кількість нуклеїнових кислот у тканинах риб може свідчити про тканинну специфічність їх вмісту. Результати проведених нами досліджень на прісноводних рибах узгоджуються з даними, отриманими на теплокровних тваринах, відносно поділу органів та тканин на такі, в яких відмічений високий (печінка, селезінка, кишківник) та низький (м'язи, мозок) вміст нуклеїнових кислот [23]. В тканинах з високим співвідношенням ядро/цитоплазма, в яких гістологічно виявляється велика кількість ядерного матеріалу, концентрація ДНК значна, тоді як у тканинах з великим об'ємом цитоплазми та численними цитоплазматичними гранулами, відмічається підвищений вміст РНК. При цьому слід відмітити, що концентрація нуклеїнових кислот в тканинах риб нижча, ніж в тканинах ссавців [7]. Однак, поряд з цим, підвищена концентрація цих біополімерів, згідно з даними літератури [6], вважається показником посиленої життєдіяльності клітини, що обов'язково супроводжується більш інтенсивним обміном речовин.

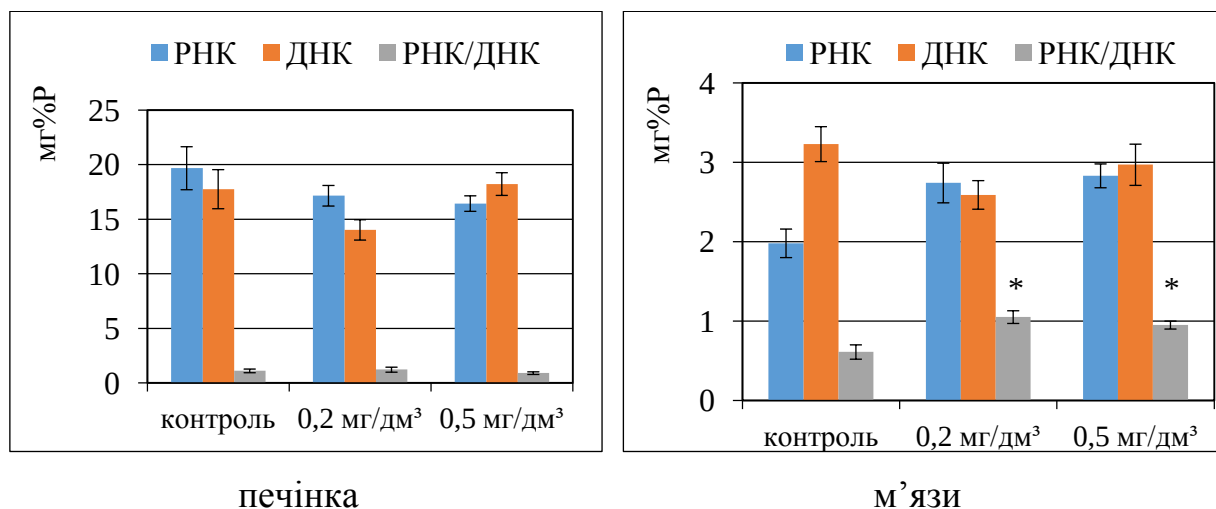


Рис. 4.2. Вплив іонів Fe^{3+} на вміст нуклеїнових кислот у тканинах щуки ($M \pm m$, $n = 5$).

В результаті дії іонів Феруму в печінці та м'язах досліджуваних видів риб змінюється також співвідношення РНК/ДНК. В печінці коропа даний показник зростає на 76,1% при 0,2 мг/дм³ та на 65,9% при 0,5 мг/дм³,

а в печінці щуки за впливу $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу у воді зростає на 9,9%, а при $0,5 \text{ мг/дм}^3$ – знижується на 18,9%. В м'язах коропа спостерігається тенденція до зниження цього співвідношення за дії іонів Fe^{3+} на 43,5% при $0,2 \text{ мг/дм}^3$ та на 46,9% при $0,5 \text{ мг/дм}^3$ (див. рис. 4.1). В м'язах щуки, навпаки, за дії іонів досліджуваного металу співвідношення РНК/ДНК зростає на 72,1% при $0,2 \text{ мг/дм}^3$ та на 55,7% за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ (рис. 4.2).

За даними автора [6] величина співвідношення РНК/ДНК може відображати транскрипційну здатність геному. Високе значення цього показника вказує на більш високі потенційні білоксинтетичні можливості цієї тканини і навпаки. Як бачимо з отриманих даних, іони заліза впливають на величину цього співвідношення, а, отже, і на активність згаданого процесу. В результаті дії підвищених концентрацій іонів металу, в основному, зростає інтенсивність синтезу білків у печінці і знижується в м'язах, що свідчить про те, що печінка більш активно реагує на зазначений чинник, м'язова ж тканина є більш консервативною.

4.2. Вплив підвищених концентрацій іонів Феруму (III) на вміст білків в тканинах коропа та щуки

Стосовно білків, які перебувають у тісному взаємозв'язку із нуклеїновими кислотами, то їх концентрації в печінці та м'язах досліджуваних видів риби за дії іонів Fe^{3+} також змінюються (рис. 4.3, 4.4). Зокрема, виявлено зростання кількості загального білка в печінці щуки за дії обох досліджуваних концентрацій іонів металу (на 29,8% при $0,2 \text{ мг/дм}^3$ та на 12,0% при $0,5 \text{ мг/дм}^3$), а також в печінці коропа при $0,5 \text{ мг/дм}^3$ на 33,4%. Отримані дані узгоджуються за даними авторів [221], які за дії токсикантів також спостерігали посилення біосинтезу білків у цьому органі. Дане явище, можливо, пов'язане з утворенням захисних білків – металотіонеїнів, що мають високий вміст і специфічне розміщення сульфгідрильних груп і забезпечуть можливість ефективного зв'язування іонів металів [156].

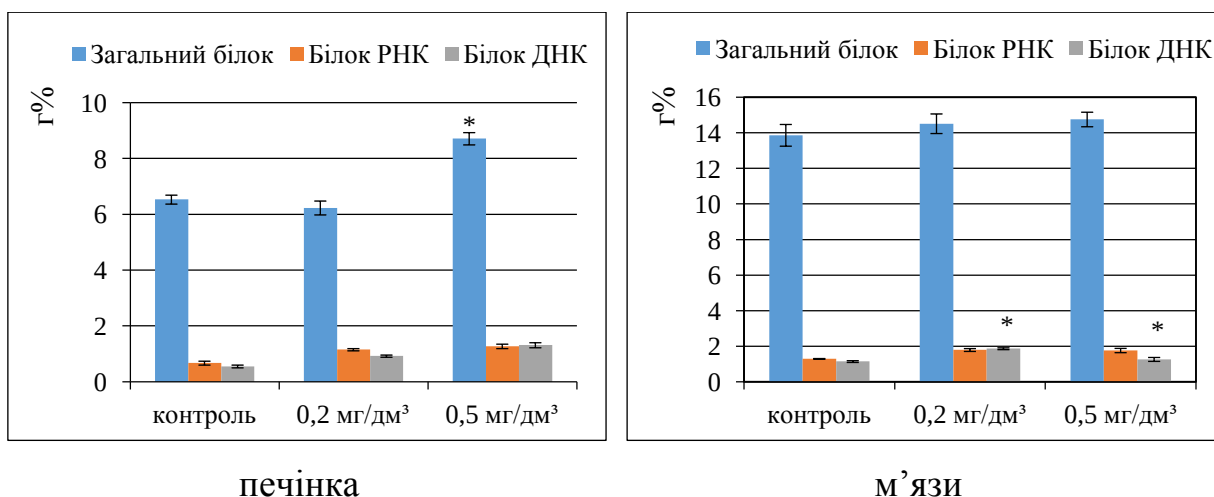


Рис. 4.3. Вплив іонів Fe^{3+} на вміст білків у тканинах коропа ($M \pm m$, $n = 5$).

В м'язах вміст загального білка за дії іонів Феруму (III) зростає як у коропа, так і у щуки. Більш значною мірою це проявляється у щуки, особливо за дії металу в кількості $0,2 \text{ мг/дм}^3$, де цей показник збільшується на 38,6% (рис. 4.4). У коропа вміст загального білка зростає приблизно на 5-6% при обох концентраціях металу (рис. 4.3).

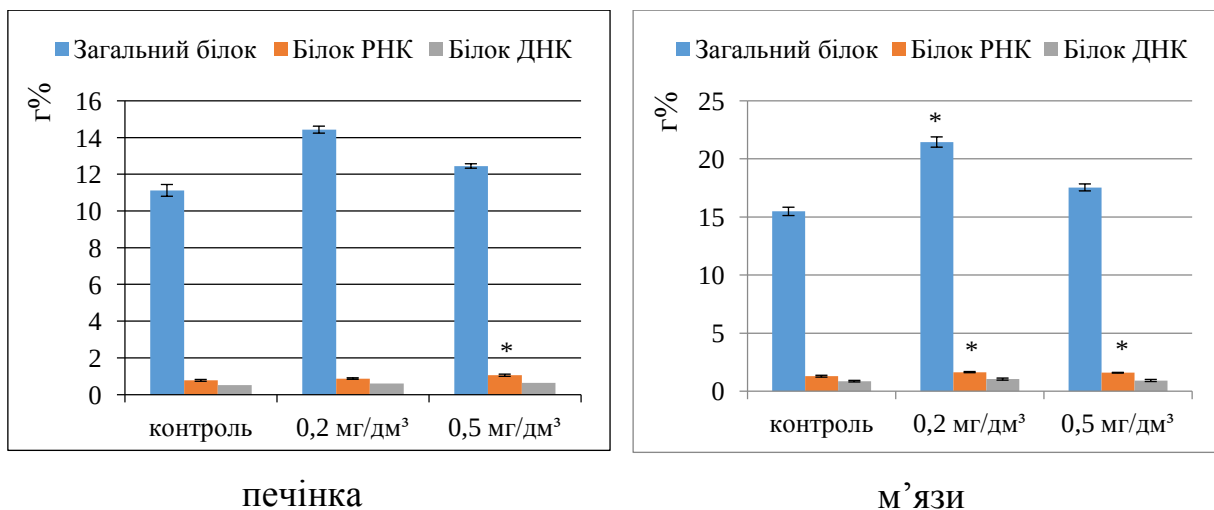


Рис. 4.4. Вплив іонів Fe^{3+} на вміст білків у тканинах щуки ($M \pm m$, $n = 5$).

Певний інтерес становить вивчення вмісту в тканинах білків, зв'язаних з нуклеїновими кислотами, тобто визначення кількості білків у гідролізатах нуклеопротеїдів [66]. Кількість білків у фракціях нуклеїнових кислот у м'язах досліджених риб дещо вища, ніж в печінці. Найбільша кількість білка у складі рибонуклеопротеїду виявлено як у коропа, так і у

щуки, де ці величини рівні. А за дії іонів металу вони зростають у обох видів риб майже однаково. В печінці риб цей показник дещо нижчий, він також зростає і в коропа, і в щуки за дії 0,2 та 0,5 мг/дм³ іонів Fe³⁺.

Білків у складі дезоксирибонуклепротеїдів дещо менше, ніж рибонуклеопротеїдів. У коропа в печінці цього білка на 107,3% менше, ніж в м'язах, а в щуки на 68,6%. За дії іонів металу вміст білка у фракції ДНК зростає в обох видів риб за дії обох концентрацій Феруму (III) як в печінці, так і в м'язах.

Отже, нами виявлено, що в різних тканинах (печінка та м'язи) вміст білків у складі нуклеопротеїдних комплексів різний, що, ймовірно, пов'язано з функціональною специфікою останніх. Було показано [28], що деякі білки можуть виконувати роль репресорів геному. Тому їх кількість в тканині може бути показником розмірів білкової блокади молекул нуклеїнових кислот.

4.3. Метаболічна активність синтезу білків та нуклеїнових кислот в тканинах риб за дії підвищених концентрацій Феруму (III) у воді

Більше інформації про метаболічні процеси в тканинах організму риб, на нашу думку, можуть надати числа-тести, які були запропоновані авторами [28] і виражають співвідношення кількості нуклеїнових кислот до відповідних білкових фракцій. Дані, отримані за допомогою зазначених чисел метаболічної активності тканин, подані в рис. 4.5, 4.6. Із них видно, що існують певні відмінності даних показників в печінці та м'язах досліджених видів риб, а також вони змінюються за дії іонів заліза.

Так, зокрема, в печінці застосовані числа метаболічної активності досягають досить високих значень, в порівнянні з такими ж у м'язах (рис. 4.5, 4.6). При цьому найвище значення «РНП-числа» відмічено в печінці у щуки, на 17,2% воно нижче у коропа. За дії металу цей показник в печінці як коропа, так і щуки знижується при обох концентраціях металу у воді, при чому 0,5 мг/дм³ викликає більш значне зниження.

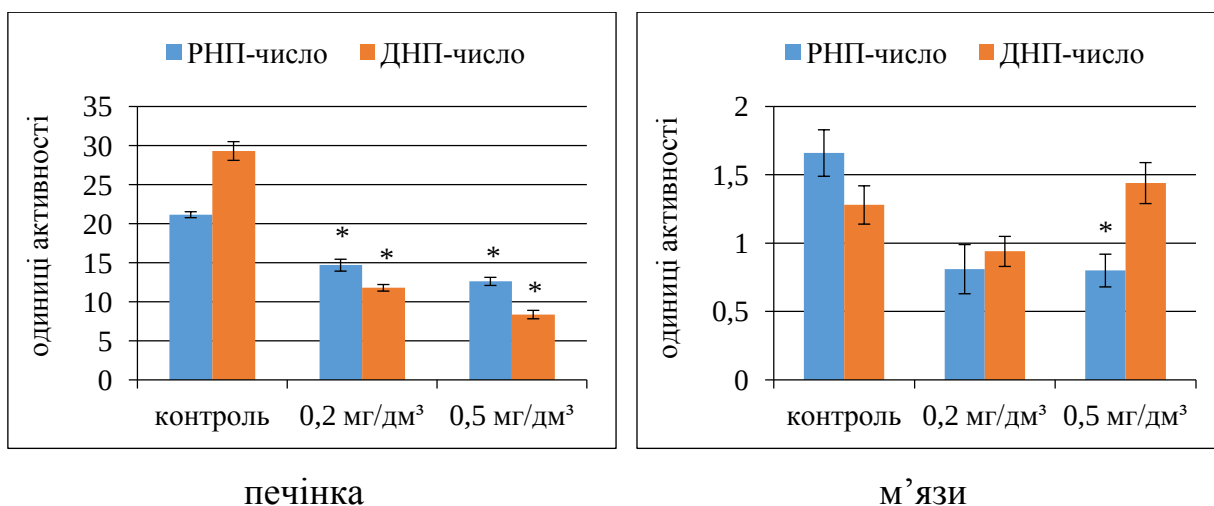


Рис. 4.5. Величини чисел метаболічної активності тканин коропа за дії іонів Феруму (III) (умовні тести, одиниці активності).

Показник «РНП-числа» в м'язах досліджених риб досить низький, в порівнянні з печінкою. Він практично рівний у коропа та щуки. За дії іонів заліза у коропа він знижується як при 0,2 мг/дм³, так і при 0,5 мг/дм³, а у щуки, навпаки, дещо зростає.

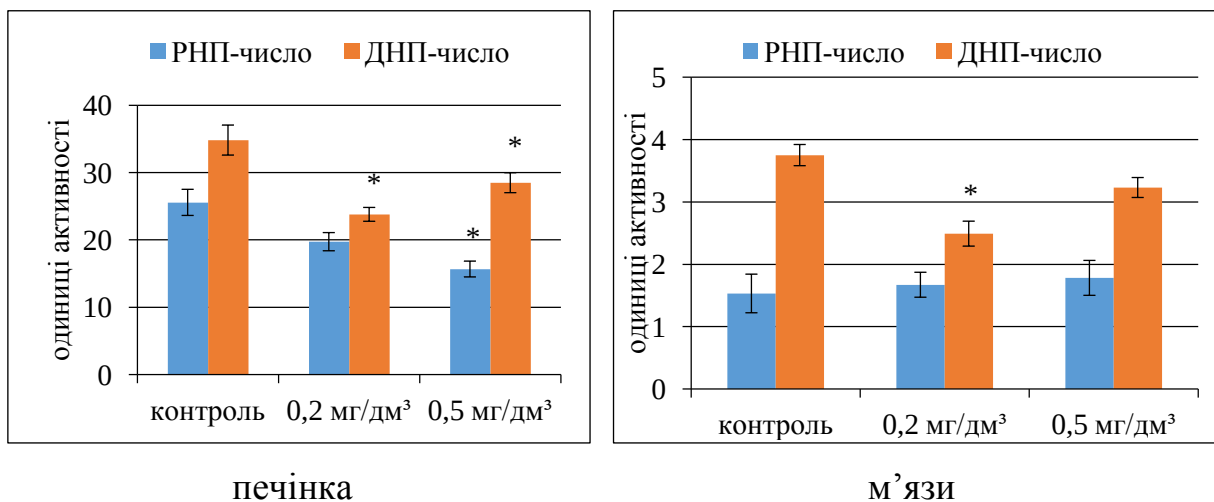


Рис. 4.6. Величини чисел метаболічної активності тканин щуки за дії іонів Феруму (III) (умовні тести, одиниці активності).

При дослідженні значень «ДНП-числа» було виявлено, що свого максимуму воно досягає в печінці щуки. На 18,8% воно менше в печінці коропа. За дії іонів заліза цей показник значно знижується в печінці коропа і дещо менше – в печінці щуки. В м'язах щуки білка у фракції ДНК у 2,9 рази більше, ніж у цій же фракції коропа. За дії іонів металу цей показник знижується і в коропа, і в щуки при обох досліджених

концентраціях заліза, при цьому більш значне зниження спостерігається при 0,2 мг/дм³ металу у воді.

4.4. Активність ферментів переамінування в тканинах коропа та щуки за умов підвищених концентрацій Fe^{3+} у воді

У процесах метаболізму амінокислот важливу роль відіграють амінотрансферази, ферменти, які беруть участь у процесах біосинтезу і розпаду амінокислот, об'єднанні шляхів вуглеводного, ліпідного та білкового обміну, а також синтезі деяких специфічних сполук, зокрема таких як сечовина та γ -аміномасляна кислота [20].

На певній стадії метаболізму в більшості амінокислот α -аміногрупа відщеплюється в результаті ферментативної реакції переамінування (трансамінування). При цьому α -аміногрупа переноситься до α -вуглецевого атома однієї із трьох кетокислот – піровиноградної, α -кетоглутарової або щавелевооцтової, в результаті чого утворюється α -кетокислота вихідної амінокислоти, а α -кетокислота перетворюється у відповідну амінокислоту [44].

Реакції переамінування (трансамінування) каталізуються трансаміназами, вони легко оборотні, а їх константи рівноваги близькі до одиниці. Трансамінази широко розповсюджені в тканинах тварин, володіють високою резистентністю до фізичних, хімічних і біологічних впливів, мають високу каталітичну активність. Найбільш активними трансаміназами у людини і тварин, у тому числі й у гідробіонтів, є аланінаміनотрансфераза (АлАТ) та аспартатамінотрансфераза (АсАТ). Добре вивчені зазначені ферменти у різних класів хребетних, включно і у риб [36].

Встановлено, що найвищу активність АлАТ і АсАТ проявляють за певної температури і оптимальних значень рН [80]. Оптимум рН для АлАТ і АсАТ зрілих яйцеклітин білого амура лежить в межах 7,5-7,6, а оваріальної рідини від 8,5 до 9,1 [35]. Для АсАТ м'язів та АлАТ печінки

коропа оптимальне значення $pH = 7,5$, а для АсАТ печінки виявлено два максимуми активності при $pH = 6,5$ та $8,5$ [80]. Окрім температури та величини pH на активність аміотрансфераз впливають деякі низькомолекулярні компоненти, зокрема піридоксаль-5-фосфат – кофермент аміотрансфераз [36]. Регулювати активність аміотрансфераз в яйцеклітинах і зародках риб можна шляхом додавання в інкубаційне середовище деяких низько- та високомолекулярних сполук. Так, активність АлАТ в незапліднених яйцеклітинах в'юна, витриманих протягом двох годин у водному середовищі, яке містило аспарагінову кислоту, зростає в 4 рази, а активність АсАТ за впливу глутамінової кислоти зменшується на 35% [40]. Активність першого ферменту зростає і в результаті додавання у водне середовище щавелевооцтової кислоти [36].

Експериментальні дані свідчать про значну роль реакцій переамінування в процесах забезпечення толерантності організму гідробіонтів до токсикантів [46]. Відмічено важливе значення трансаміназ в адаптивному перерозподілі азотистих резервів організму [77]. На основі відомих даних про зростання в тканинах гідробіонтів вмісту одних амінокислот та зменшення рівня інших за дії аміаку [17] та іонів важких металів [39] можна припустити, що роль трансаміназ полягає не стільки в прямій детоксикації ксенобіотиків, скільки у адаптивному перерозподілі білкових та амінокислотних резервів організму, пов'язаних як безпосередньо із детоксикацією, так і енергетичним забезпеченням.

Виходячи із сказаного, метою цієї частини роботи стало вивчення впливу іонів заліза (Fe^{3+}) на активність аланін- та аспартатаміотрансфераз в організмі двох видів досліджуваних риб – коропа (*Cyprinus carpio* L.) та щуки (*Esox lucius* L.).

4.4.1. Активність АЛАТ та АсАТ в тканинах коропа за умов підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді

Отримані нами дані свідчать про те, що підвищені концентрації іонів Феруму (III) у воді впливають на активність амінотрансфераз в тканинах досліджених видів риб. Так, зокрема, в організмі коропа активність аланінамінотрансферази в печінці знижується за дії металу в концентрації $0,2 \text{ мг/дм}^3$ на 3,5%, в той час як за дії металу в кількості $0,5 \text{ мг/дм}^3$ вона зростає на 20,3% (рис. 4.7). Активність аланінамінотрансферази в сироватці крові значно нижча, ніж у печінці (рис. 4.8). При цьому за впливу іонів заліза в кількості $0,2 \text{ мг/дм}^3$ її активність знижується на 17,0% і зростає на 73,5% за дії металу в концентрації $0,5 \text{ мг/дм}^3$.

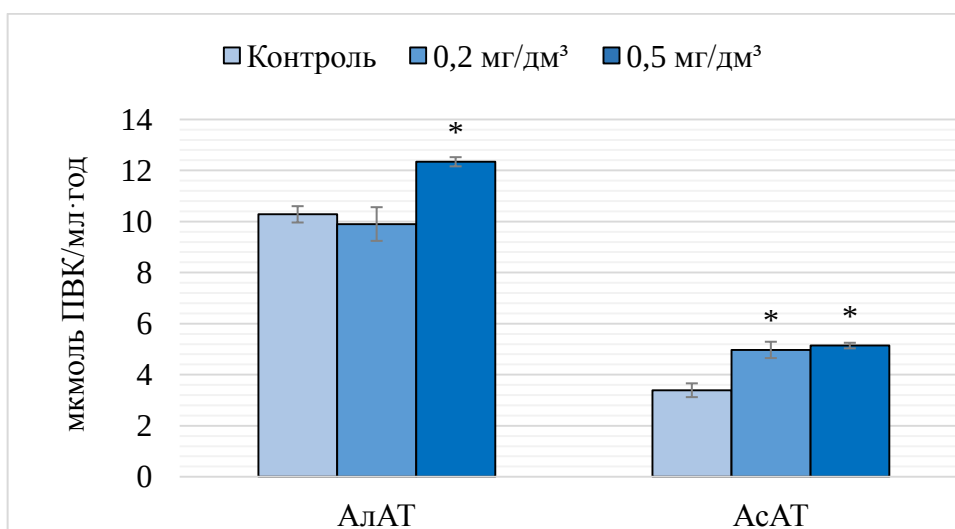


Рис. 4.7. Активність трансаміназ в печінці коропа за дії іонів Fe^{3+} (мкмоль ПВК/г·год), $M \pm m$, $n=5$.

Посилення в тканинах коропа активності аланінамінотрансферази за дії високої концентрації металу ($0,5 \text{ мг/дм}^3$), очевидно, пов'язане з активацією системи детоксикації аміаку, яка полягає у синтезі аланіну і спрямована на підтримання кислотно-лужного гомеостазу шляхом зв'язування аміаку піруватом. В літературі є дані про зміщення рівноваги реакції в бік утворення аланіну за інтоксикації, а відтак його накопичення в організмі [18].

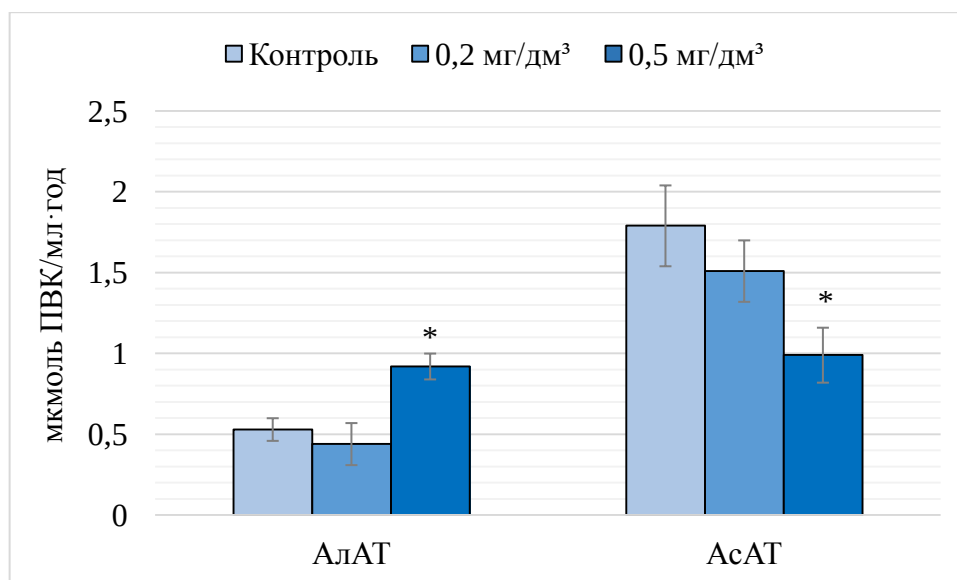


Рис. 4.8. Активність трансаміназ в сироватці крові коропа за дії іонів Fe^{3+} (мкмоль ПВК/мл·год), $M \pm m$, $n=5$.

Примітка: * – зміни порівняно з контролем вірогідні ($P < 0,05$).

При дослідженні активності аспартатамінотрансферази в тканинах коропа було показано, що активність цього ферменту в печінці зростає за дії обох досліджених концентрацій Феруму (III) (рис. 4.7, 4.8). При $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу у воді цей показник зростає на 46,6%, а при $0,5 \text{ мг/дм}^3$ – на 51,6%, що свідчить про активну участь цього ферменту в процесах детоксикації. Авторами [77] в печінці коропа було виявлено два максимуми активності аспартатамінотрансферази при рН 6,5 і 8,5, що вказує на те, що досліджуваний фермент печінки складається із цитоплазматичної та мітохондріальної форм. Таке явище, очевидно, є результатом адаптації риб до дії іонів важких металів, до яких належать і іони Fe^{3+} , та спрямоване на підтримання процесів переамінування в печінці риб в більш широких межах рН.

Динаміка зміни активності аспартатамінотрансферази в сироватці крові при дії досліджуваного металу протилежна до динаміки змін її активності в печінці риб. Вона знижується на 15,6% при $0,2 \text{ мг/дм}^3$ заліза та на 44,7% при $0,5 \text{ мг/дм}^3$. Отже, зміна активності трансаміназ в сироватці

крові коропа за дії іонів Феруму (III) є пристосуванням ферментного апарату клітин крові до різних умов існування.

4.4.2. Активність АЛАТ та АсАТ в тканинах щуки за умов підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді

При дослідженні трансаміназ в тканинах щуки нами також виявлені певні зміни їх активності за дії іонів Fe^{3+} (рис. 4.9, 4.10). Так, активність аланінамінотрансферази в печінці риб знижується при обох значеннях досліджених концентрацій. За впливу $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу у воді на 20,8%, а при $0,5 \text{ мг/дм}^3$ – на 21,7%. В сироватці крові ж щуки, навпаки, активність цього ферменту зростає на 37,1% при $0,2 \text{ мг/дм}^3$ та на 19,6% при $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Феруму (III) у воді. Підвищення активності аланінамінотрансферази в сироватці крові риб, можливо, пов'язане з участю цього ферменту у процесах знешкодження аміаку, який утворюється в організмі риб за умов токсикозу, викликаного іонами важких металів. Принцип дії полягає у зв'язуванні аміаку в місцях його утворення в нетоксичний глутамін (глутамінсинтетазна реакція), транспорт його з током крові до зябер з наступним розщепленням глутаміназою і виведенням аміаку в зовнішнє середовище [17].

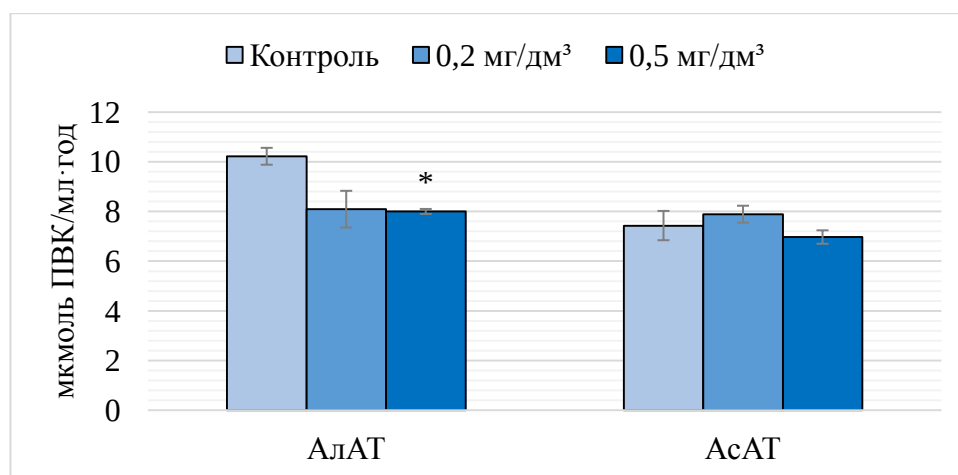


Рис. 4.9. Активність трансаміназ в печінці щуки за дії іонів Fe^{3+} (мкмоль ПВК/г·год), $M \pm m$, $n=5$.

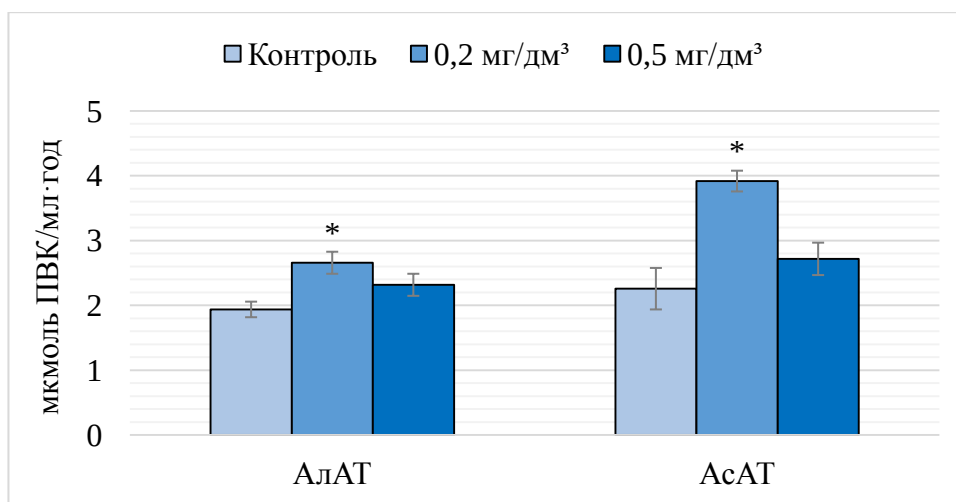


Рис. 4.10. Активність трансаміназ в сироватці крові щуки за дії іонів Fe^{3+} (мкмоль ПВК/г·год), $M \pm m$, $n=5$.

При вивченні активності аспартатамінотрансферази нами виявлено незначні відхилення від контролю цього показника в печінці щуки. Він збільшувався на 6,2% при $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Феруму (III) у воді і зменшувався на 6,2% при $0,5 \text{ мг/дм}^3$ металу. При цьому в крові даного виду риб зміни активності аспартатамінотрансферази були більш значними. Так, при $0,2 \text{ мг/дм}^3$ цей показник зростав на 73,4%, а при $0,5 \text{ мг/дм}^3$ – на 20,3%.

Активація аспартатамінотрансферази є основною ланкою малат-аспартатного човникового шляху, який посилює своє функціонування при стимуляції фізіологічних функцій організму [44]. Аспартатамінотрансфераза, шунтуючи цикл Кребса, веде до того, що активно окиснюється не лимонна, а бурштинова кислота. Таким чином, головною функцією швидкого шляху генерації енергії є прискорене утворення і окиснення бурштинової кислоти, що дає організму можливість одержати швидше більше молекул АТФ, ніж при окисненні інших інтермедіатів циклу трикарбонових кислот [34].

Згідно отриманих даних слід вважати, що реакція систем переамінування за дії іонів важких металів [39] та Феруму зокрема має тканинну та видову специфіку і залежить від концентрації металу у водному середовищі. Адаптація організму риб до дії токсиканта полягає у

мобілізації пулу інтермедіатів та перебудові обміну речовин у напрямку протидії на вплив зовнішнього стрес-фактору. Роль трансаміназ у цьому процесі полягає у перерозподілі амінокислотних резервів з метою використання одних для детоксикації аміаку (глутамат, аспартат, аланін), інших – в енергетичних цілях у зв'язку із зростанням енерговитрат організму на процеси адаптації [67].

Висновки до розділу 4

Вміст та обмін білків і нуклеїнових кислот в організмі риб нерозривно пов'язаний як у нормі, так і за умов адаптації їх до несприятливих чинників оточуючого водного середовища.

Дія підвищених концентрацій Fe^{3+} індукувала зростання кількості РНК у печінці коропа і м'язах щуки та зниження вмісту її в печінці щуки і м'язах коропа. Кількість ДНК знижується в печінці коропа та м'язах щуки за дії обох досліджуваних концентрацій іонів Fe^{3+} і зростає в печінці щуки (лише за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$) та м'язах коропа. Зміни співвідношення РНК/ДНК та чисел метаболічної активності за дії іонів заліза свідчать про посилення експресії геному та біосинтезу білків, що підтверджується зростанням загальної кількості цих біополімерів у досліджуваних тканинах риб.

Слід відмітити, що реакція систем переамінування за дії іонів Феруму має тканинну та видову специфіку і залежить від концентрації металу у водному середовищі. Так, як в печінці, так і сироватці крові коропа за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} активність аланінамінотрансферази зростає. Активність аспартатамінотрансферази за впливу підвищених концентрацій іонів Феруму зростає в печінці та знижується в сироватці крові коропа, пропорційно до концентрації іонів Fe^{3+} у середовищі.

Активність аланінамінотрансферази в печінці щуки знижується при обох концентраціях іонів Феруму (III). У сироватці крові риб відмічене зростання як аланін-, так і аспартатамінотрансферази лише за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу. Реакція системи переамінування в тканинах досліджених

прісноводних риб за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} свідчить про перебудову амінокислотного та білкового метаболізму з метою забезпечення енергетичної та пластичної адаптації до стрес-дії токсиканта.

За результатами представленими в розділі 4, опубліковані наступні роботи:

1. Рабченюк О.О., Хоменчук В.О., Бияк В.Я., Курант В.З. Вплив йонів заліза на активність білково-нуклеїнового обміну в організмі коропа та щуки. *Сучасні проблеми теоретичної і практичної іхтіології* : мат. IX Міжнар. іхтіологічної науково-практич. конф., 14–16 вересня 2016 р. Одеса : ТЕС, 2016. С. 217–220.
2. Рабченюк О.О., Бияк В.Я., Хоменчук В.О., Курант В.З. Активність трансаміназ в організмі прісноводних риб за дії йонів заліза. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія*. 2016. № 1 (65). С. 130–134.
3. Rabcheniuk O.O., Biyak V.Ya., Khomenchuk V.O. & Kurant V.Z. Protein-nucleic metabolism in freshwater fishes under impact of ferum ions. *Hydrobiological Journal*. 2017. Vol. 53, Iss. 4. P. 85–93.
4. Курант В.З., Хоменчук В.О., Рабченюк О.О., Далєвська Д.Я., Ляврін В.З. Метали як регулятори білкового обміну в організмі прісноводних риб. *ТЕРНОПІЛЬСЬКІ БІОЛОГІЧНІ ЧИТАННЯ — TERNOPIL BIOSCIENCE — 2017* : мат. Всеукр. науково-практич. конф. з міжнародною участю, присвяченої 20-річчю заснування наукового фахового видання України «Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія Біологія», 20–22 квітня 2017 р. Тернопіль : «Терно-граф», 2017. С. 132–135.

РОЗДІЛ V. РОЛЬ КРОВІ РИБ У ЇХ АДАПТАЦІЇ ДО ДІЇ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ФЕРУМУ (III) У ВОДІ

Кров є найважливішою поліфункціональною системою, яка об'єднує всі тканини та органи цілісного організму та динамічно реагує на зміни як внутрішнього, так і зовнішнього середовища. Гематологічні показники, володіючи високою лабільністю та чутливістю, за несприятливих умов зовнішнього середовища є інформативними індикаторами патологічних процесів як у окремих особин, так і популяцій риб [31]. Параметри крові прісноводних риб диких популяцій (поки що не трансформованих діяльністю людини) можна використовувати як еталонні норми при оцінці стану здоров'я інших популяцій [25]. Тому, ми намагались дослідити та проаналізувати окремі показники крові риб за впливу підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді.

5.1. Загальні показники крові риб за дії іонів Феруму (III)

Аналіз одержаних результатів показав, що за дії обох досліджуваних концентрацій іонів Fe^{3+} має місце тенденція до зростання кількості еритроцитів у коропа та щуки (табл. 5.1). Проте дана величина знаходиться в межах норми для даних видів риб [26].

Підвищене значення гематокриту риб може бути свідченням згущення крові чи стресу. Низьке значення гематокритного числа може бути наслідком анемії, гемолізу чи пошкодження зябер [25]. Гематокритне число досліджуваних видів риб за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} не зазнає достовірних змін. Очевидно, 14-денний термін інтоксикації іонами Феруму (III) недостатній для того, щоб відбулися глибокі структурно-функціональні зміни крові в організмі коропа та щуки.

Рівень гемоглобіну у коропа збільшується за впливу $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} ($p < 0,05$), тоді як у щуки рівень пігменту достовірно знижується за даної концентрації іонів металу. Очевидно в даному випадку відмінності

обумовлені екологічними та фізіолого-біохімічними особливостями даних видів риб.

Таблиця 5.1.

Гематологічні показники коропа та щуки за дії Fe^{3+}

Показники крові	Короп			Щука		
	Контроль	0,2 мг/дм ³	0,5 мг/дм ³	Контроль	0,2 мг/дм ³	0,5 мг/дм ³
Кількість еритроцитів, млн./мм ³	1,4±0,1	1,5±0,2	1,5±0,2	1,8±0,1	2,1±0,3	1,8±0,2
Гематокрит, %	35,2±2,3	29,0±2,5	39,8±2,4	37,0±2,1	31,3±4,0	32,3±2,3
Гемоглобін, г/дм ³	76,9±7,6	85,1±3,5	109,6±5,6*	91,3±10,1	69,9±14,2	71,5±3,9*
Білок плазми, г/дм ³	33,3±2,1	29,4±1,5	43,9±2,7*	37,4±3,0	35,2±2,0	35,9±2,9
Активність лактат-дегідрогенази, нМоль НАДН/хв×мг білка	6,0±1,1	3,3±0,3*	12,5±1,7*	3,3±0,8	4,3±0,6	7,3±1,8*

Примітка: * – зміни порівняно з контролем вірогідні ($p < 0,05$).

Зміни вмісту білків у плазмі крові можуть слугувати індикатором патологічних процесів в організмі [65]. Рівень білків у плазмі крові достовірно зростає лише за дії максимальної концентрації іонів металу у коропа (табл. 5.1) Очевидно, високі концентрації іонів Феруму (III) обумовлюють посилений розпад білків тканин коропа, що, в свою чергу, сприяє зростанню їх кількості у крові риб.

Активність лактатдегідрогенази у плазмі коропа зростає за дії 0,5 мг/дм³ іонів Fe^{3+} як у щуки, так і коропа, що опосередковано свідчить про активацію анаеробного енергозабезпечення та пригнічення циклу трикарбонових кислот.

В цілому, кількість гемоглобіну крові, вміст білка плазми та активність лактатдегідрогенази плазми крові риб можуть бути використані для оцінки забруднення водного середовища іонами Феруму (III).

5.2. Особливості зв'язування Феруму трансферином плазми крові коропа та щуки

В процесі еволюції природа не розвинула ефективних механізмів виведення Феруму з організму еукаріотів, тому оптимальна концентрація металу може підтримуватися лише за рахунок обмеження його поглинання [130].

Серед білків, що безпосередньо пов'язані із регуляцією вмісту Феруму в організмі тварин, у тому числі риб, слід виділити трансферин. Трансферин, виявлений у широкому колі організмів, він зустрічається в різних генетично залежних формах, які подібні за своїми фізико-хімічними властивостями та мають молекулярну масу близько 70-80 кДа [114]. Трансферин – це складний білок (глікопротеїд) плазми крові, який відноситься до β -глобулінів і має здатність зв'язувати і переносити іони трьохвалентного Феруму. Основною функцією трансферину плазми крові є транспорт Феруму у ретикулоцити, де відбувається синтез гемоглобіну, а також підтримання на певному рівні співвідношення іонів Fe^{2+} та Fe^{3+} . Разом з тим, трансферин тісно пов'язаний з імунною системою риб і бере участь у неспецифічних гуморальних механізмах захисту від бактеріальних інфекцій [121, 240].

Хоча менше 1% Феруму в організмі риб зв'язано з трансферином – це найбільш лабільна форма даного металу в організмі тварин [130]. Тому значний інтерес представляє вивчення особливостей зв'язування Феруму трансферином плазми крові риб за умов підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді.

Аналіз отриманих результатів показав, що вміст Феруму в плазмі крові коропа зростав за дії 0,2 та 0,5 мг/дм³ іонів Fe^{3+} у 1,3 і в 1,2 рази

відповідно (рис. 5.1; $p < 0,05$). Одночасно із зростанням кількості заліза в плазмі крові коропа мало місце пропорційне до концентрації іонів Феруму (III) у воді збільшення вмісту трансферину за дії 0,2 та 0,5 мг/дм³ іонів Fe^{3+} у воді відповідно (рис. 5.2). При цьому максимальний показник насичення трансферину металом у коропа був відмічений за впливу 0,2 мг/дм³ іонів Fe^{3+} – 43,5% проти 35,1% контрольного значення (рис. 5.3).

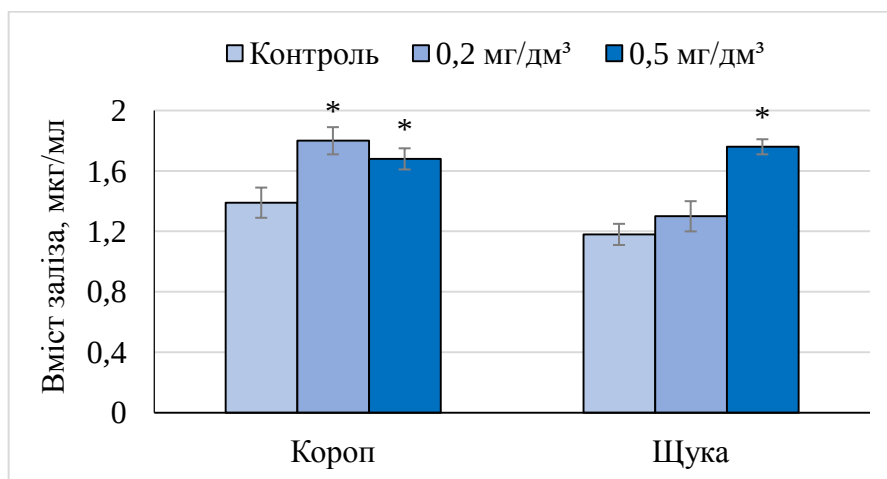


Рис. 5.1. Концентрація загального заліза в плазмі крові коропа та щуки за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді ($M \pm m$, $n=5$).

Примітка: * – зміни порівняно з контролем вірогідні ($p < 0,05$).

Кількісні характеристики зв'язування Феруму трансферинном крові щуки за впливу підвищених концентрацій іонів Феруму (III) у воді були відмінними від коропа (див. рис. 5.1–5.3). Відмічено максимальне акумулювання заліза плазмою крові щуки (1,76 мг/дм³ проти 1,18 мг/дм³ в контролі) за дії 0,5 мг/дм³ іонів Fe^{3+} . Разом з тим у плазмі крові щуки мало місце зменшення кількості трансферину в 1,13 та 1,15 рази за дії 0,2 та 0,5 мг/дм³ іонів Феруму (III). Зростання кількості металу в організмі тварин та порушення функціональної активності печінки, як правило, призводить до зниження синтезу трансферину і навпаки – залізодефіцитні стани призводять до зростання вмісту даного металопротеїду [60].

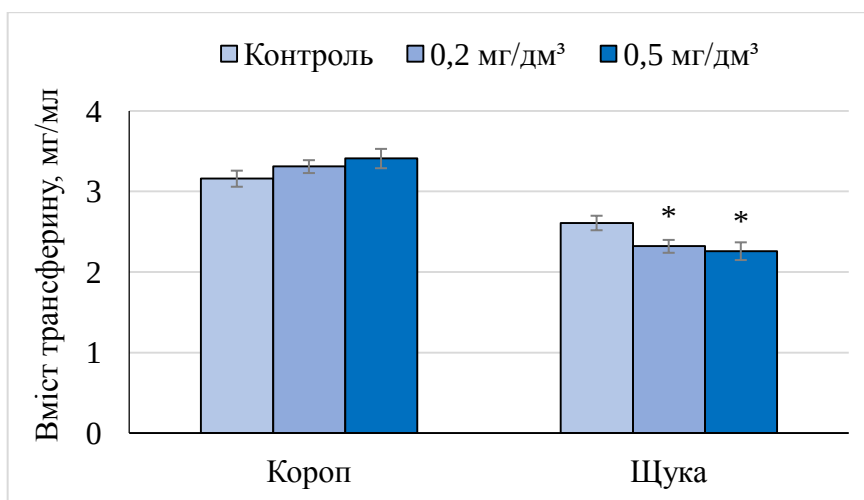


Рис. 5.2. Концентрація трансферину в плазмі крові риби за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді ($M \pm m$, $n=5$).

Примітка: * – зміни порівняно з контролем вірогідні ($p < 0,05$).

Пропорційно концентрації іонів Fe^{3+} у воді зростає і показник насичення трансферину металом. Так, у плазмі крові риби контрольної групи він становить 36,2%, а у риби за дії 0,2 та 0,5 мг/дм³ іонів металу – 44,8 і 62,4% відповідно.

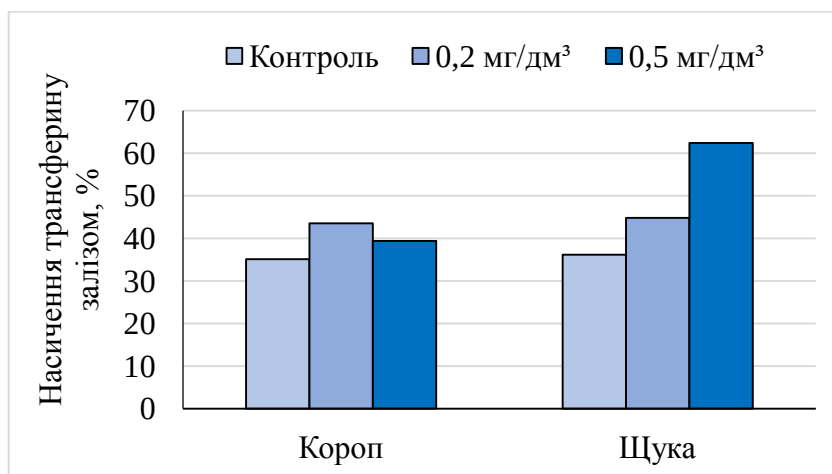


Рис. 5.3. Насичення Ферумом трансферину в плазмі крові риби за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді ($M \pm m$, $n=5$).

Надлишок Феруму, що супроводжується зростанням показника насичення залізом трансферину може свідчити про токсичну дію іонів металу та призводити до паталогії печінки, адже відомо, що для риби частка насичення трансферину залізом є нижчою, ніж для ссавців [114].

Висновки до розділу 5

Дія підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді призводить до суттєвих змін гематологічних показників коропа та щуки. Відмічено зростання кількості гемоглобіну і білка плазми у крові коропа та зниження вмісту гемоглобіну у щуки за впливу $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} ($p < 0,05$). Активність лактатдегідрогенази зростає за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} як у щуки, так і у коропа, що опосередковано свідчить про активацію анаеробного енергозабезпечення та пригнічення циклу трикарбонових кислот. Кількість гемоглобіну крові, вміст білка плазми та активність лактатдегідрогенази плазми крові риб можуть бути використані для оцінки забруднення водного середовища іонами Феруму (III).

Підвищений вміст іонів Fe^{3+} у воді призводить до зростання кількості металу в плазмі крові обох видів риб та збільшення показника насичення трансферину залізом (особливо у щуки). Дані показники можуть бути використані як біомаркери інтоксикації організму риб іонами Fe^{3+} .

За результатами представленими в розділі 5, опубліковані наступні роботи:

1. Рабченюк О.О., Хоменчук В.О., Курант В.З. Вплив підвищених концентрацій йонів Fe^{3+} на гематологічні показники коропа та щуки. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія*. 2015. № 2 (63). С. 28–31.
2. Рабченюк О.О., Голіней Г.М., Марценюк В.М, Сідлецька О.В., Хоменчук В.О. Вплив підвищених концентрацій Fe^{3+} на деякі показники крові коропа. *Концепція сталого розвитку та її реалізація в освіті* : мат. науково-практич. конф., присвяченої 75-річчю ТНПУ ім. В. Гнатюка та хіміко-біологічного факультету, 16–18 квітня 2015 р. Тернопіль : Видавн. відділ ТНПУ ім. В. Гнатюка, 2015. С. 91–93.
3. Рабченюк О.О. Вплив підвищених концентрацій йонів Fe^{3+} у воді на вміст заліза та трансферину у плазмі крові риб. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія*. 2018. № 2 (73). С. 83–87.

4. Рабченюк О.О., Хоменчук В.О., Станіславчук А.В., Ковалик І.Г., Курант В.З. Зв'язування заліза трансферином плазми крові коропа та щуки за умов підвищених концентрацій йонів Fe^{3+} у водному середовищі. *ТЕРНОПІЛЬСЬКІ БІОЛОГІЧНІ ЧИТАННЯ — TERNOPIL BIOSCIENCE — 2018* : мат. Всеукр. науково-практич. конф. з міжнародною участю, 19-21 квітня 2018 р. Тернопіль : «Вектор», 2018. С. 127–130.

РОЗДІЛ VI. ВПЛИВ ІОНІВ ФЕРУМУ (III) НА ЛІПІДНИЙ ОБМІН ТА ПРОЦЕСИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ В ТКАНИНАХ КОРОПА ТА ЩУКИ

Внаслідок більш глибокого вивчення ліпідного та жирнокислотного складу окремих тканин риб, а також дослідження молекулярних механізмів регуляції їх метаболізму розширилися уявлення про роль ліпідів у процесах адаптації цього класу екзотермних організмів до дії чинників оточуючого водного середовища [42, 64, 77].

Тому метою даного розділу стало вивчення впливу підвищених концентрацій іонів Феруму у воді на ліпідний обмін в організмі коропа та щуки.

6.1. Вплив іонів Fe^{3+} на ліпідний склад досліджуваних тканин риб

Стійкість клітинних мембран, пристосованих до несприятливих чинників оточуючого водного середовища, пов'язують з якісними і кількісними змінами у їх складі триацилгліцеролів (ТАГ), диацилгліцеролів (ДАГ), неестерифікованих жирних кислот (НЕЖК), холестеролу (ХЛ), моноацилгліцеролів (МАГ) та фосфоліпідів (ФЛ).

Збереження функціональної активності біологічних мембран клітин гідробіонтів за дії несприятливих (хімічних) чинників середовища забезпечується модуляцією роботи векторних ферментів та якісними і кількісними змінами у складі полярних та неполярних ліпідів.

На основі аналізу отриманих даних слід зазначити суттєві зміни щодо вмісту окремих фракцій ліпідів у тканинах прісноводних риб за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді. Так, відмічено достовірне зростання кількості МАГ і НЕЖК за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ та ДАГ за впливу $0,5 \text{ мг/дм}^3$ металу у зябрах коропа (рис. 6.1, 6.2). Зябра риб є багатофункціональним органом (дихання, іонорегуляція, підтримання кислотно-основного балансу, екскреція) та становлять більше 50%

загальної площі поверхні тварини. З огляду на це зябра є не тільки основним місцем поглинання більшості поллютантів, але й першочерговою мішенню їх токсичної дії [231].

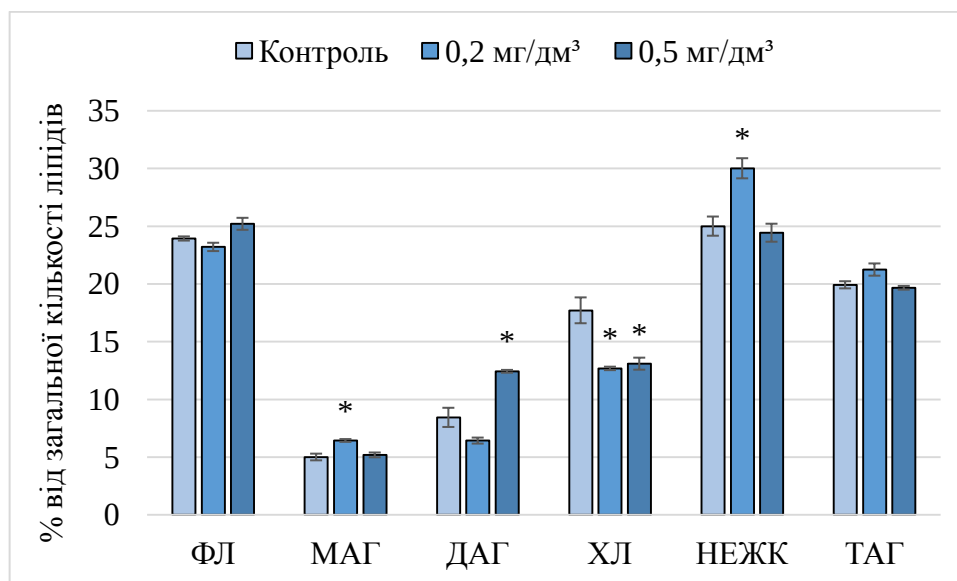


Рис. 6.1. Вміст окремих класів ліпідів в клітинах зябер коропа за дії іонів Феруму (в % від загальної кількості ліпідів, $M \pm m$, $n=5$).

Примітка: * – тут і далі зміни порівняно з контролем достовірні ($P < 0,05$).

Зростання кількості неестерифікованих жирних кислот, моноацилгліцеролів та диацилгліцеролів свідчить про активацію ліполітичних процесів в організмі коропа та формування катаболічного стрес-синдрому в умовах інтоксикації [64].

Разом з тим вміст ХЛ щодо контрольної групи риб достовірно зменшувався у 1,4 та у 1,3 рази за дії 0,2 та 0,5 мг/дм³ іонів металу відповідно. Такі зміни мають дещо суперечливий характер, так як природною роллю холестеролу є зміцнення і упорядкування мембрани шляхом посилення взаємодій між окремими фосфоліпідами, що утворюють мембрану [117].

Очевидно зменшення кількості ХЛ призводить до незначного зростання плинності біліпідного шару та збільшення ролі фосфоліпідів у регуляції активності мембрано-зв'язаних ферментів [267]. Ефект

зменшення в'язкості частково компенсується внаслідок змін у співвідношенні фосфоліпідів [74].

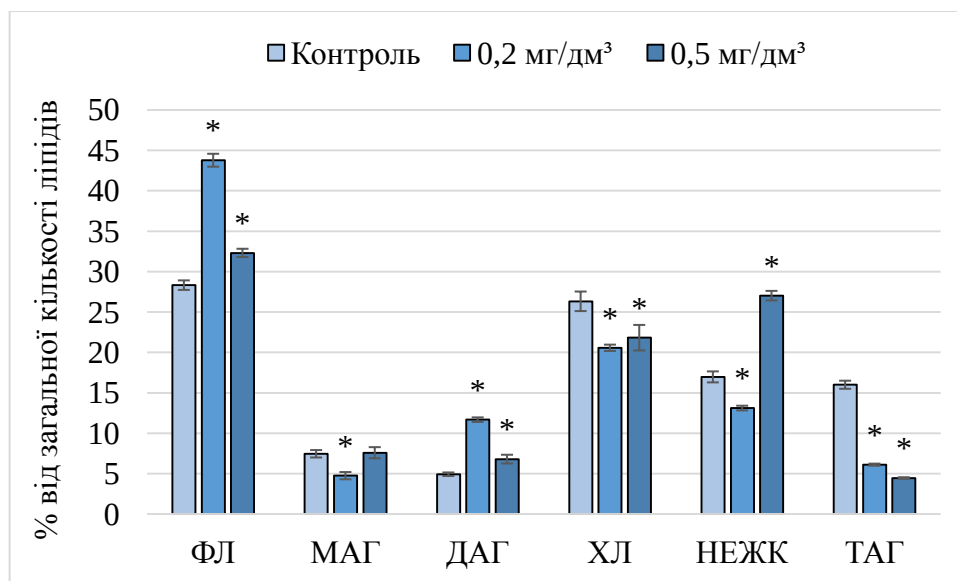


Рис. 6.2. Вміст окремих класів ліпідів в клітинах зябер щуки за дії іонів Феруму (в % від загальної кількості ліпідів, $M \pm m$, $n=5$).

Характерним є те, що кількість фосфоліпідів та ТАГ у зябрах коропа за дії іонів Fe^{3+} практично не змінювалася відносно контролю (рис. 6.1).

У щуки характер змін у кількісному складі ліпідів клітин зябер за впливу підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} дещо інший. Так, слід відмітити зростання частки фосфоліпідів у 1,5 рази за дії 0,2 мг/дм³ та у 1,1 рази за 0,5 мг/дм³ іонів Fe^{3+} . Такі зміни вмісту ФЛ у зябрах щуки можна розглядати як своєрідну адаптивну відповідь організму на підвищені концентрації іонів Fe^{3+} , шляхом структурно-функціональних перебудов біологічних мембран. Відомо, що транспорт металів через клітинні мембрани здійснюється за участю фосфоліпідів та залежить від їх складу і може моделюватися під впливом іонів металів [237].

Слід відмітити, що зі зростанням концентрації іонів металу в воді у зябрах щуки спостерігається посилення ліполізу, ймовірно, внаслідок активації іонами металу специфічних ліпаз [226]. Так, за дії 0,2 мг/дм³ іонів Fe^{3+} зростала в 2,3 рази кількість ДАГ та зменшувався у 2,6 рази вміст ТАГ, тоді як за впливу 0,5 мг/дм³ іонів металу у клітинах зябер щуки

підвищувався вміст НЕЖК та ДАГ у 1,6 і 1,4 рази відповідно, а кількість ТАГ зменшувалася у 3,5 рази ($p < 0,05$). Частка ХЛ у зябрах щуки, як і в коропа, знижувалася за впливу обох досліджуваних концентрацій Феруму відносно контролю ($p < 0,05$). Очевидно за дії підвищених концентрацій іонів металу проходить порушення його синтезу [143].

Печінка – першочергова мішень більшості токсичних агентів. Цей орган забезпечує депонування та виведення з організму багатьох металів. Окрім того у печінці синтезуються сироватковий холестерол і ліпіди [231].

Якщо проаналізувати характер змін кількості ліпідів у печінці риб за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} , то можна відмітити дещо іншу специфіку їх перерозподілу порівняно з зябрами (рис. 6.3, 6.4). На відміну від зябер, відмічене зменшення у 1,2 рази кількості ФЛ у печінці коропа за впливу $0,2 \text{ мг/дм}^3$ та у 1,3 рази за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ металу. Це може бути як наслідком посилення ліполізу [64], так і порушення синтезу фосфоліпідів в печінці риб за умов токсичного стресу [235].

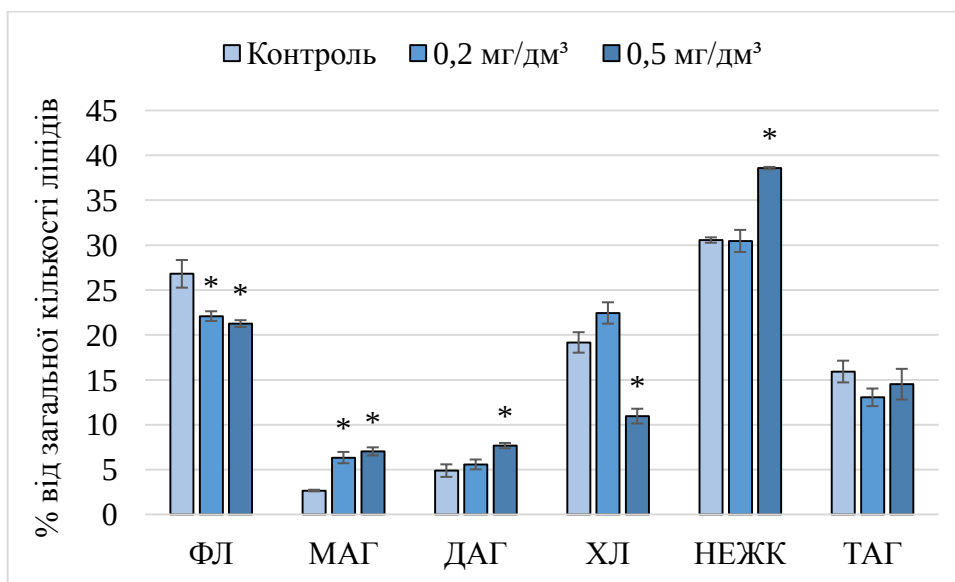


Рис. 6.3. Вміст окремих класів ліпідів в клітинах печінки коропа за дії іонів Феруму (в % від загальної кількості ліпідів, $M \pm m$, $n=5$).

Слід відзначити достовірне зростання МАГ у обох видів риб дослідних груп, що, очевидно, обумовлено посиленням ліполізу ТАГ внаслідок зростання енергетичних витрат для протидії надлишковим

кількостям металу в організмі риб [64]. Це підтверджується зростанням кількості НЕЖК у гепатоцитах як коропа, так і щуки, за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} та зменшенням кількості ТАГ у дослідних групах риб щодо контролю. На посилення катаболічних процесів вказує і зростання в 1,6 рази кількості ДАГ у гепатоцитах коропа за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} та у 2,3 рази – у печінці щуки за впливу $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу ($p < 0,05$).

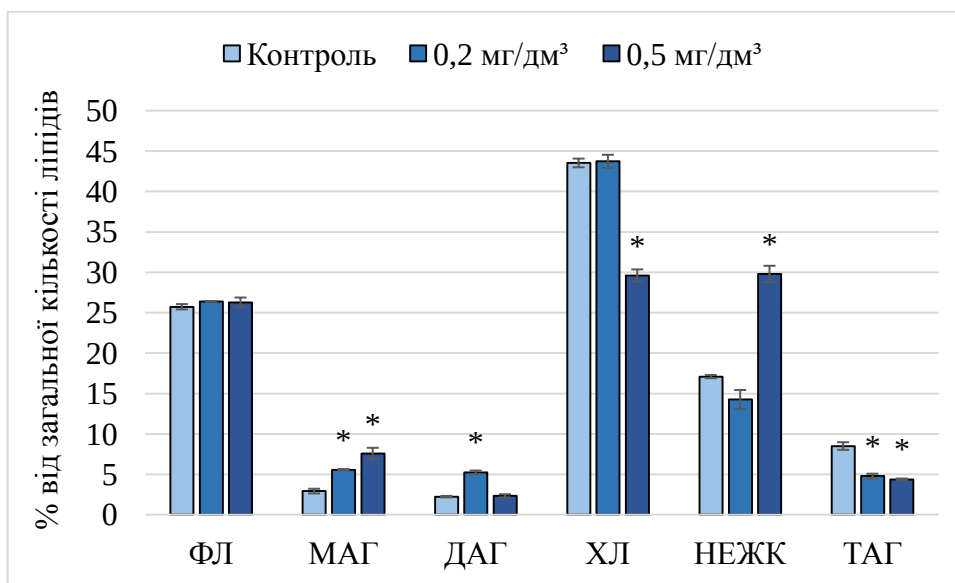


Рис. 6.4. Вміст окремих класів ліпідів в клітинах печінки щуки за дії іонів Феруму (в % від загальної кількості ліпідів, $M \pm m$, $n=5$).

За дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Феруму як у печінці коропа, так і щуки, відмічено зменшення кількості ХЛ у 1,7 та у 1,5 рази відповідно ($p < 0,05$). Очевидно, іони Fe^{3+} порушують структуру біологічних мембран гепатоцитів, адже холестерол сильно впливає на плинність мембрани, встановлюючи специфічні взаємодії з вуглеводневими ланцюгами та головними групами фосфоліпідів [117].

Нирки є одним з органів, що забезпечують осморегуляцію та екскрецію металів, в тому числі і Феруму, з організму риб [168]. Проте кількість Феруму, що виводиться через нирки, є доволі незначною [267], як і кількість металу, яка акумулюється в цих органах за 14-денний термін [50].

У нирках риби за умов підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді чітко прослідковується видова специфіка змін у фракційному складі ліпідів. Так, у нирках коропа спостерігається зростання кількості ФЛ у обох дослідних групах щодо контролю ($p < 0,05$), тоді як у щуки відмічено тенденцію до зменшення кількості фосфоровмісних ліпідів (рис. 6.5, 6.6).

Одержані дані узгоджуються з наявними в літературі фактами про активацію синтезу фосфоліпідів, як своєрідного захисту клітин організму від проникнення через їх мембрану токсикантів [260].

За дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ металу у нирках коропа відмічено зменшення вмісту ДАГ у 1,6 рази та НЕЖК у 1,7 рази. Разом з тим кількість МАГ зростає у 1,9 рази, а вміст ТАГ знижується у 1,6 рази. Такі зміни ліпідного профілю вказують на активацію синтезу ФЛ з їх попередників та, ймовірно, використання останнього класу ліпідів для енергозабезпечення адаптивних перебудов клітин.

У клітинах нирок коропа за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} зменшується вміст МАГ, НЕЖК та ХЛ, а кількість ДАГ і ТАГ зростає ($p < 0,05$). Відомо, що ТАГ сприяють стабілізації клітинних мембран, і у стресових умовах вони можуть виступати попередниками синтезу ДАГ і НЕЖК [183].

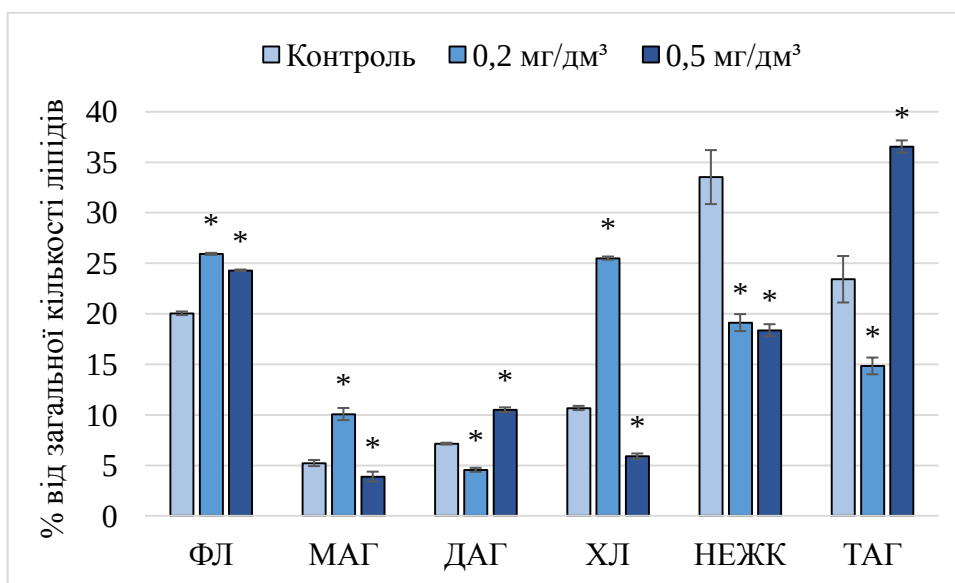


Рис. 6.5. Вміст окремих класів ліпідів в клітинах нирок коропа за дії іонів Феруму (в % від загальної кількості ліпідів, $M \pm m$, $n=5$).

Вміст холестеролу за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} відносно контролю зростає у 2,5 рази у коропа та у 1,5 рази у щуки. Природною роллю холестеролу є ущільнення і упорядкування мембрани шляхом зміцнення взаємодій між окремими фосфоліпідами, що утворюють мембрану [117, 143].

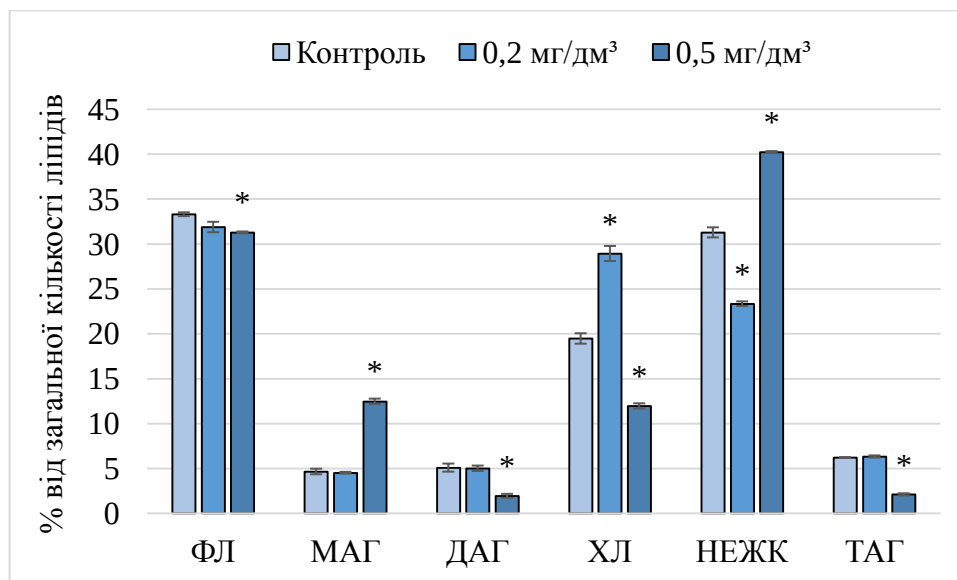


Рис. 6.6. Вміст окремих класів ліпідів в клітинах нирок щуки за дії іонів Феруму (в % від загальної кількості ліпідів, $M \pm m$, $n=5$).

У нирках щуки за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} відмічено зменшення кількості НЕЖК. Вплив $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів досліджуваного металу викликав зменшення кількості ТАГ та ДАГ, тоді як вміст НЕЖК та МАГ зростає, що, очевидно, свідчить про інтенсифікацію ліполітичних процесів у клітинах нирок з підвищенням концентрації Fe^{3+} у воді [64]. Отже, в цілому зміни фракційного складу ліпідів у клітинах нирок коропа та щуки мають виражену залежність від концентрації іонів Феруму у воді.

В м'язах риб, як і в нирках за дії іонів Fe^{3+} відмічаються видові особливості змін у складі ліпідів (рис. 6.7, 6.8). Так, у коропа має місце зменшення кількості ФЛ за дії обох досліджуваних концентрацій металу, що може бути обумовлено порушенням синтезу фосфоліпідів як в печінці, так і в м'язах [214]. В клітинах м'язів щуки відмічено достовірне зростання вмісту ФЛ лише за впливу $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} .

За дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} має місце зростання вмісту МАГ і НЕЖК та зменшення кількості ДАГ та ТАГ у м'язах коропа. Вплив $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу викликав лише достовірне зростання кількості МАГ. В цілому слід зазначити, що відбувається активне використання ліпідних резервів м'язів, особливо ТАГ, для енергетичного забезпечення підтримання гомеостазу Феруму в організмі коропа. Такі закономірності можуть спостерігатися як при гострому [172], так і хронічному [49] отруєнні металами.

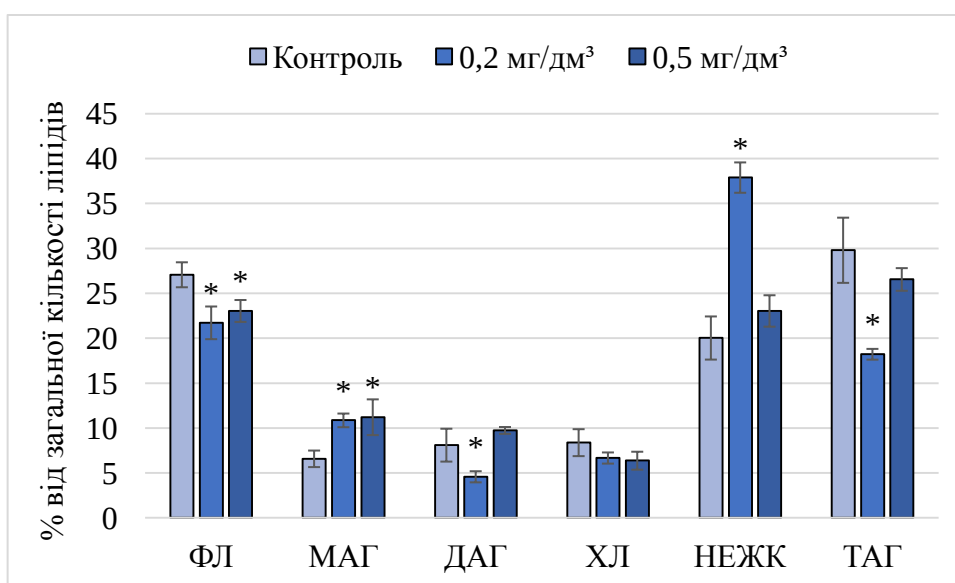


Рис. 6.7. Вміст окремих класів ліпідів в клітинах м'язів коропа за дії іонів Феруму (в % від загальної кількості ліпідів, $M \pm m$, $n=5$).

У клітинах м'язів щуки за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} відмічено зниження кількості МАГ і ТАГ та зростання кількості ДАГ і ХЛ. За впливу $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} у м'язах *Esox lucius* має місце зростання кількості МАГ і НЕЖК та зниження кількості ТАГ, що може бути наслідком активації ліпаз іонами металу, в результаті зростання енерговитрат для обмеження надходження, зв'язування та посилення екскреції металу з організму риб.

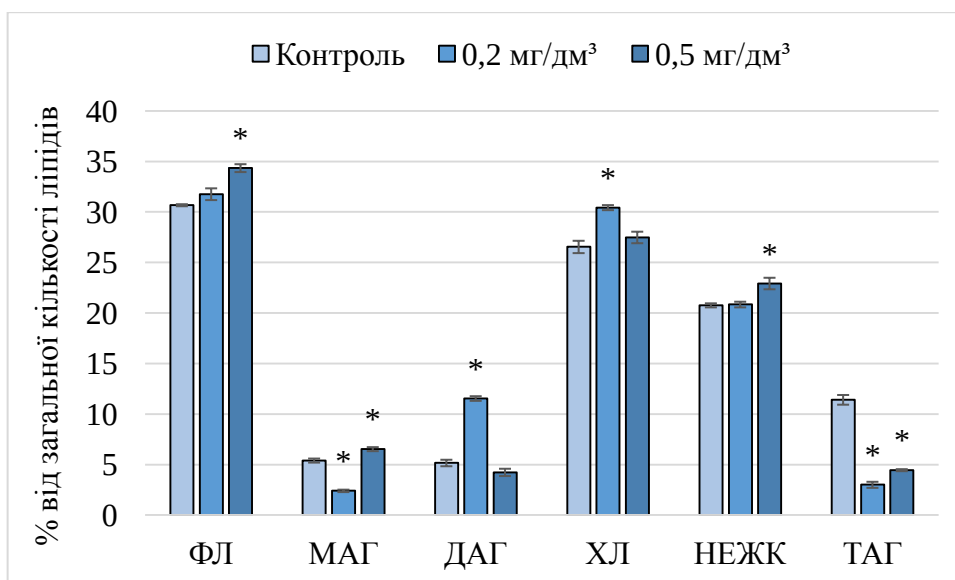


Рис. 6.8. Вміст окремих класів ліпідів в клітинах м'язів щуки за дії іонів Феруму (в % від загальної кількості ліпідів, $M \pm m$, $n=5$).

Функціональним показником активності біомембрани є відношення холестерол/фосфоліпіди [117]. Слід зазначити, що від величини цього показника залежить щільність упаковки ліпідних молекул в мембрані, її текучість та проникність. У клітинах зябер як коропа, так і щуки має місце зменшення даного показника (табл. 6.1), що в цілому вказує на зменшення кристалічності мембран клітин зябер та зростання регулятивної ролі фосфоліпідів у її складі [237].

За дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Феруму відмічено зменшення показника відношення холестерол/фосфоліпіди у печінці досліджуваних видів риб (табл. 6.1), що опосередковано вказує на збільшення плинності мембран та регулятивної активності фосфоліпідів у їх складі [237].

Натомість, за впливу $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} в коропа цей показник збільшився у 1,4 раза, що співвідноситься зі зростанням мікров'язкості та зниженням проникності мембран для іонів металів [142].

У клітинах нирок коропа та щуки відмічено зростання показника відношення холестерол/фосфоліпіди за впливу $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} у 1,8 та 1,6 рази відповідно (табл. 6.1). Збільшення частки холестеролу робить

мембрану більш стійкою до зовнішнього стресу, підвищує її стійкість і знижує її проникність до води та іонів [208].

Натомість, за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу цей показник зменшився у 2,2 рази у коропа і 1,5 рази у щуки. Одержані дані підтверджують збільшення плинності мембран та регулятивної активності фосфоліпідів у їх складі [237].

Таблиця 6.1.

Відношення холестерол/фосфоліпіди в клітинах тканин риб за дії іонів Fe^{3+}
($M \pm m$, $n=5$)

Вид риб	Тканина	Група риб		
		Контроль	$0,2 \text{ мг/дм}^3$	$0,5 \text{ мг/дм}^3$
Короп	Зябра	$0,74 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,02^*$	$0,52 \pm 0,03^*$
	Печінка	$0,72 \pm 0,05$	$1,01 \pm 0,06^*$	$0,52 \pm 0,02^*$
	Нирки	$0,53 \pm 0,04$	$0,98 \pm 0,05^*$	$0,24 \pm 0,03^*$
	М'язи	$0,31 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,05$	$0,28 \pm 0,02$
Щука	Зябра	$0,93 \pm 0,04$	$0,47 \pm 0,02^*$	$0,68 \pm 0,05^*$
	Печінка	$1,69 \pm 0,04$	$1,66 \pm 0,06$	$1,13 \pm 0,03^*$
	Нирки	$0,58 \pm 0,03$	$0,91 \pm 0,04^*$	$0,38 \pm 0,04^*$
	М'язи	$0,86 \pm 0,03$	$1,02 \pm 0,04^*$	$0,80 \pm 0,06$

Примітка: * – зміни порівняно з контролем достовірні ($P < 0,05$).

Аналіз даних відношення холестерол/фосфоліпіди у м'язах показав зростання цього показника у щуки за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Феруму (табл. 6.1).

Очевидно, має місце зменшення плинності мембрани, адже зміна у співвідношенні холестерол / фосфоліпіди істотно модулює фізико-хімічні і функціональні властивості клітинних мембран та забезпечує їх фазові переходи з гелеподібного в рідкокристалічний стан [194].

Слід відзначити, що амплітуда та характер змін ліпідного складу досліджуваних тканин коропа та щуки за дії $0,2$ та $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Феруму

визначаються концентрацією іонів металу, видом риб та метаболічною активністю тканин.

З огляду на суттєві зміни вмісту фосфоліпідів у тканинах коропа та щуки за умов впливу підвищених концентрацій іонів Феруму (III) у воді доцільно дослідити особливості їх фракційного складу та роль окремих класів фосфорвмісних ліпідів в адаптації організму риб до металів.

6.2. Роль фосфоліпідів у формуванні стійкості організму риб до підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді

За дії іонів Феруму відмічаються дозозалежні та видоспецифічні зміни фосфоліпідного спектру клітин зябер досліджуваних видів риб. Так, за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ металу прослідковується активація синтезу фосфоліпідів у клітинах досліджуваної тканини коропа, тоді як дія $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Феруму в коропа та вплив обох концентрацій заліза у щуки індукує їх деструкцію.

За дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} спостерігається вірогідне зростання у 2,05 раза вмісту ФХ (рис. 6.9, 6.10). Такі кількісні зміни концентрації фосфоліпиду можуть бути пов'язані з активацією його синтезу з фосфатидилетаноламіну за участю метилтрансфераз [176].

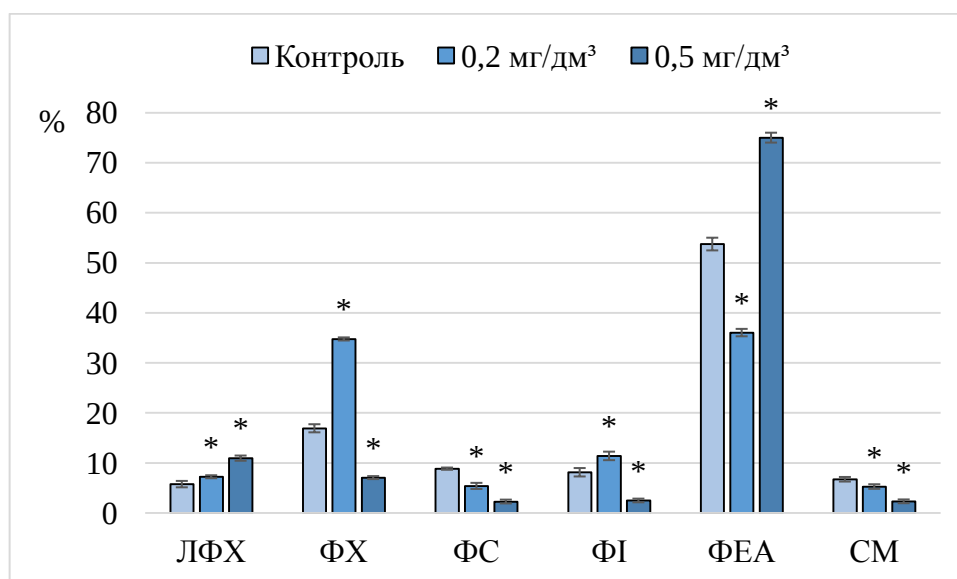


Рис. 6.9. Співвідношення фракцій фосфоліпідів в клітинах зябер коропа за дії іонів Феруму ($M \pm m$, $n=5$).

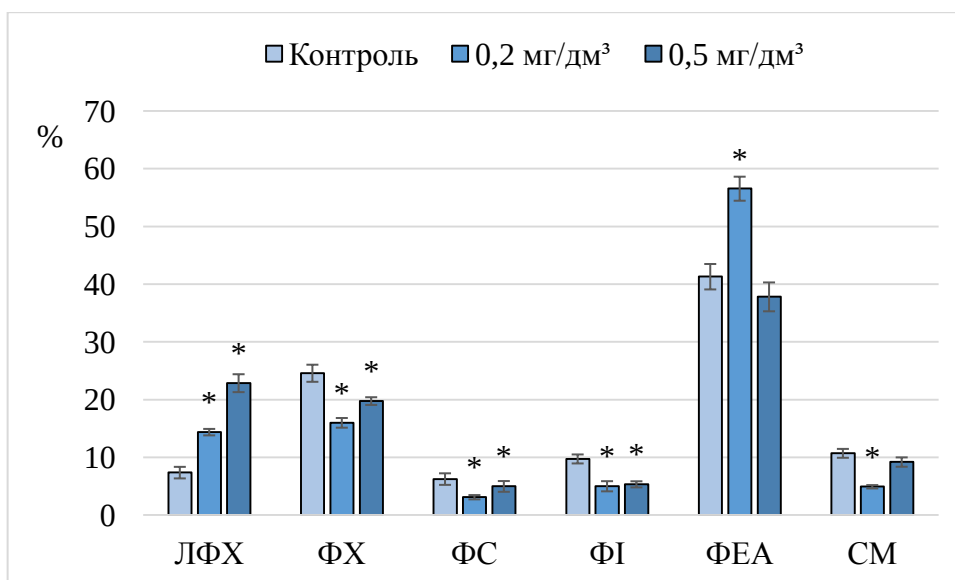


Рис. 6.10. Співвідношення фракцій фосфоліпідів в клітинах зябер щуки за дії іонів Феруму ($M \pm m$, $n=5$).

Підтвердженням цього є достовірне зниження у 1,49 раза вмісту ФЕА у зябрах коропа. Очевидно, внаслідок зниження вмісту ФЕА відбувається активація анаплеротичних шляхів відновлення його пулу, одним з них є декарбоксилювання ФС [182], підтвердженням чого є зниження вмісту останнього в 1,63 раза ($p < 0,05$).

У зябрах коропа, аклімованого до впливу $0,2 \text{ мг/дм}^3$ металу, вміст сфінгомієліну знизився у 1,28 раза, що, ймовірно, викликано загальним зростанням вмісту ФЛ, бо кількість цього холін-вмісного ліпиду практично не відрізняється від контрольних величин.

За дії обох концентрацій іонів Феруму (ІІ) у воді в щуки та $0,5 \text{ мг/дм}^3$ металу в коропа індукували схожі зміни ФЛ складу. Так, спостерігається загальна тенденція до зниження вмісту ФХ та зростання кількості ЛФХ ($p < 0,05$). Такі зміни, очевидно, вказують на інтенсифікацію процесів ензиматичного гідролізу фосфатидилхоліну внаслідок активації іонами металу лізосомальної фосфоліпази A_2 [185].

Збільшення вмісту фосфатидилетаноламіну в зябрах обох видів риб ($p < 0,05$), ймовірно, викликано як інгібуванням іонами металу його перетворення у ФХ [13] за участю метилтрансфераз [176], так і можливою

активацією його синтезу із ФС за участю фосфатидилсериндекарбоксилази [32]. Опосередкованим підтвердженням цього припущення є достовірне зниження вмісту фосфатидилсерину у досліджуваній тканині аклімованих риб. Такі зміни ФЕА можна розглядати як один з механізмів адаптації клітин риб до дії іонів Fe^{3+} , бо відомо, що накопичення цього ліпиду веде до ущільнення мембрани та зниження її проникності [149].

Вірогідне зниження вмісту фосфатидилінозитулу ($p < 0,05$), ймовірно, обумовлено активацією іонами Феруму (III) фосфоліпаз C та A_2 , адже відомо, що цей фосфоліпід є субстратом вказаних вище ензимів [101, 213]. З іншого боку, зниження вмісту ФІ може бути компенсаторною реакцією на розвиток гіперкальцемії внаслідок дії іонів важких металів [88], що призвело б до подальшої активації Ca^{2+} -залежної фосфоліпази A_2 [87, 230].

Оцінку біологічних змін фосфоліпідного складу здійснили на основі коефіцієнтів відношення вмісту фракцій цих фосфоліпідів (табл. 6.2).

Таблиця 6.2.

Вплив іонів Феруму на співвідношення різних фракцій
фосфоліпідів в зябрах риб

Досліджувані показники	Контроль	0,2 мг/дм ³	0,5 мг/дм ³
Короп			
ФХ/(ФЕА +ФІ+ФС)	0,24 ± 0,04	0,57 ± 0,08*	0,09 ± 0,01*
ФХ / ФС	1,91 ± 0,13	4,60 ± 0,32*	3,12 ± 0,23*
ФЕА / ФС	6,08 ± 0,21	6,49 ± 0,39	33,12 ± 0,53*
СМ / ФХ	0,4 ± 0,03	0,21 ± 0,04*	0,32 ± 0,02*
Щука			
ФХ/(ФЕА +ФІ+ФС)	0,43 ± 0,09	0,25 ± 0,04*	0,31 ± 0,05
ФХ / ФС	3,93 ± 0,32	5,13 ± 0,15*	4,96 ± 0,28
ФЕА / ФС	6,60 ± 0,29	18,13 ± 0,64*	7,58 ± 0,27*
СМ / ФХ	0,43 ± 0,04	0,31 ± 0,04*	0,52 ± 0,02*

За дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ металу встановлено вірогідне збільшення у 2,38 раза співвідношення $[\text{ФХ}/(\text{ФЕА}+\text{ФІ}+\text{ФС})]$ у клітинах зябер коропа, що вказує на збільшення частки ліпідів зовнішнього шару мембрани. Подібна асиметрія розміщення фосфоліпідів сприяє модуляції проникності біомембрани.

Вірогідне зростання величини показника $\text{ФХ}/\text{ФС}$ підтверджує інтенсифікацію синтезу фосфатидилхоліну з його попередників — фосфатидилетаноламіну і фосфатидилсерину.

Зниження співвідношення $\text{СМ}/\text{ФХ}$ обумовлене достовірним накопиченням фосфатидилхоліну та відсутністю достовірних кількісних змін СМ порівняно з контрольними значеннями.

За дії обох концентрацій Феруму (ІІІ) в шуки та $0,5 \text{ мг/дм}^3$ металу в коропа відмічається вірогідне зниження співвідношення $[\text{ФХ}/(\text{ФЕА}+\text{ФІ}+\text{ФС})]$. Такі зміни вказують на накопичення фосфоліпідів внутрішнього шару мембрани, що сприяє збільшенню мікров'язкості мембран, але у той же час, і її проникності.

За впливу підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} спостерігається загальна тенденція до зростання співвідношень $\text{ФХ}/\text{ФС}$ та $\text{ФЕА}/\text{ФС}$. Однакові зміни цих показників обумовлені різною активністю метаболізму фосфоліпідів. Так, аналіз фосфоліпідного складу клітин зябер риб показав вірогідне зростання концентрації ФЕА та зниження вмісту ФХ, тому очевидним є активація перетворення фосфатидилсерину у фосфатидилетаноламін, внаслідок його декарбоксилювання, у той же час зростання показника $\text{ФХ}/\text{ФС}$ обумовлене значним зниженням концентрації ФС.

Зростання співвідношення $\text{СМ}/\text{ФХ}$ в зябрах шуки за впливу $0,5 \text{ мг/дм}^3$ металу вказує на перерозподіл фракцій фосфоліпідів зовнішнього шару мембрани, що сприяє збільшенню її щільності і, відповідно, зниженню її проникності.

Вплив підвищених концентрацій іонів Феруму на клітини гепатопанкреасу риб носить видоспецифічний характер. Так, дія токсиканту на коропа індукувала у досліджуваній тканині синтез ліпідів, при цьому вказаний ефект носить дозозалежний характер. Натомість у печінці шуки встановлено катаболізм фосфоліпідів, при цьому, найвища інтенсивність цього процесу спостерігається за інтоксикації $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонами Fe^{3+} .

На такі висновки для гепатоцитів коропа наштовхує збільшення кількості обох холін-вмісних фосфоліпідів – фосфатидилхоліну та сфінгомієліну, відповідно, у 2,65 і 1,64 раза за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Феруму та у 1,70 і 2,12 раза за впливу $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу (рис. 6.11). Як уже зазначалося вище, такі зміни ФХ можуть бути результатом активації метилтрансфераз [250]. Підтвердженням цього є достовірне зниження вмісту ФЕА мембрани, відповідно, у 2,23 і 1,44 раза. Зростання концентрації СМ, ймовірно, є наслідком активації перетворення ФХ у СМ за участю церамідхолінфосфотрансферази [182]. Такі зміни сприяють ущільненню мембрани та, відповідно, зменшенню її проникності для іонів металу [149].

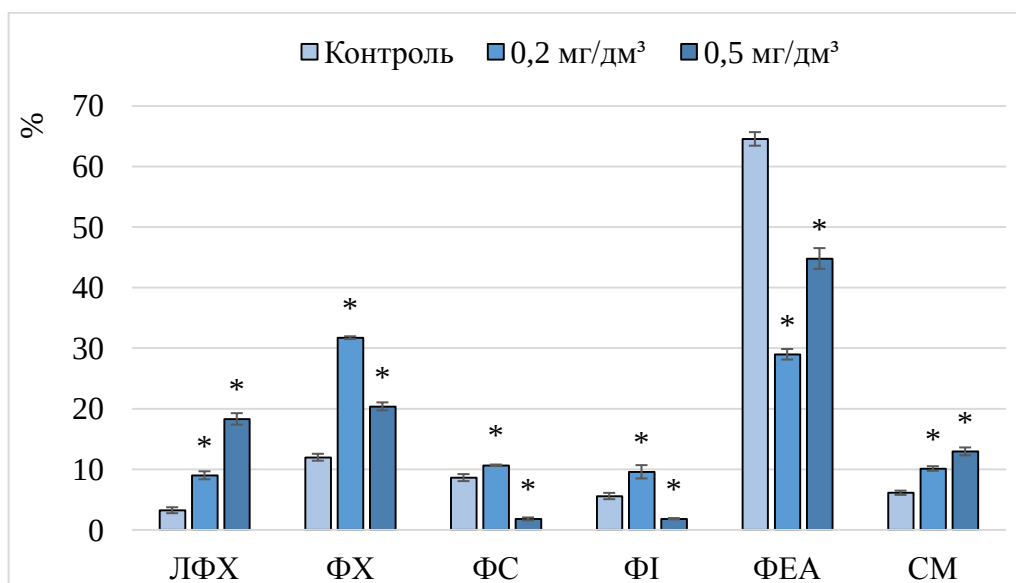


Рис. 6.11. Співвідношення фракцій фосфоліпідів в клітинах гепатопанкреасу коропа за дії іонів Феруму ($M \pm m$, $n=5$).

Вірогідне зростання у 1,72 раза вмісту ФІ за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ Феруму (III) може бути обумовлено необхідністю збільшення регуляції метаболізму в клітині, бо відомо, що підвищені концентрації іонів металів виступають у ролі активаторів ензимів [165, 268, 271]. Натомість зниження кількості цього ФЛ за інтоксикації $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} , ймовірно, є наслідком активації фосфоліпази С [84, 252] та фосфоліпази A_2 , для якої цей фосфоліпід є неспецифічним субстратом [192].

Щодо змін вмісту ФС, то за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу в гепатоцитах коропа кількість ліпиду зросла у 1,24 раза, що, ймовірно, є компенсаторною реакцією на інтенсифікацію використанням ФЕА, як попередника холін-вісних ФЛ. Натомість зниження вмісту цього ліпиду у гепатопанкреасі коропа, аклімованого до дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ металу, можливо, викликано активацією фосфатидилсериндекарбоксилази [32] і використання ФС як попередника у синтезі ФЕА, адже кількість останнього зросла, порівняно з показниками риб за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} .

Зміни вмісту ФЛ гепатоцитів щуки, аклімованої до впливу підвищених концентрацій іонів Феруму (III), схожі до перебудов фосфоліпідного профілю клітин зябер цих риб (рис. 6.12).

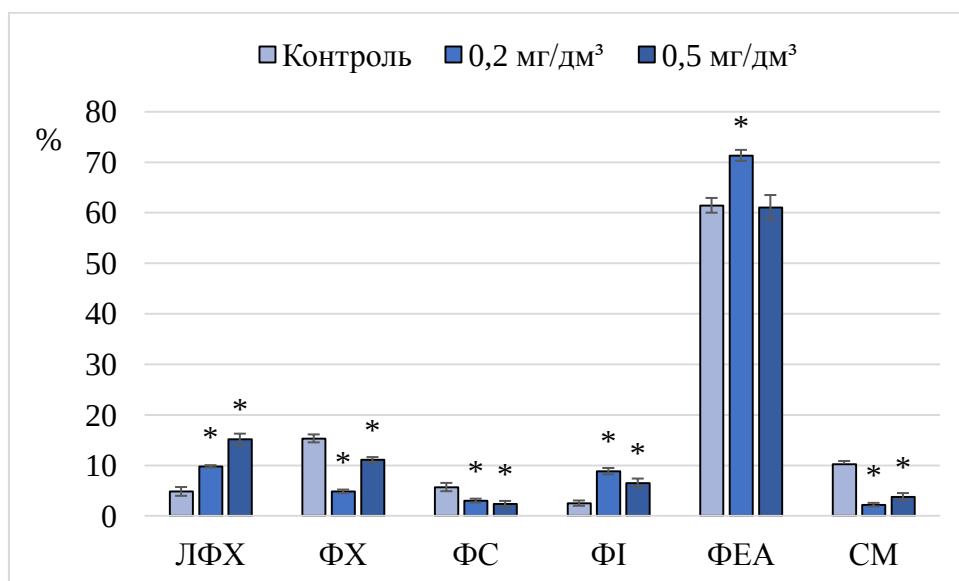


Рис. 6.12. Співвідношення фракцій фосфоліпідів в клітинах гепатопанкреасу щуки за дії іонів Феруму ($M \pm m$, $n=5$).

Встановлено зниження вмісту ФХ та зростання кількості ЛФХ ($p < 0,05$), при цьому найвища інтенсивність гідролізу фосфатидилхоліну фосфоліпазою A_2 [185] встановлена за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ металу. У той же час накопичення ($p < 0,05$) основного ФЛ внутрішнього ліпідного шару мембран клітин, ймовірно, викликано як інгібуванням іонами металу його перетворення у ФХ [13], так і активацією його синтезу із ФС за участю фосфатидилсериндекарбоксилази [32], опосередкованим підтвердженням останнього є достовірне зниження вмісту фосфатидилсерину у досліджуваній тканині риб.

Відмінним є збільшення вмісту фосфатидилінозиту ($p < 0,05$) у складі біліпідного шару гепатоцитів, що може бути обумовлене зростанням необхідності в регуляції пластичного обміну в цих клітинах, внаслідок зростання кількості акумульованого металу [146, 207].

Оцінку біологічних змін фосфоліпідного складу здійснили на основі коефіцієнтів відношення вмісту фракцій цих фосфоліпідів (табл. 6.3).

Таблиця 6.3.

Вплив іонів Феруму на співвідношення різних фракцій
фосфоліпідів в клітинах гепатопанкреасу риб

Досліджувані показники	Контроль	$0,2 \text{ мг/дм}^3$	$0,5 \text{ мг/дм}^3$
Короп			
ФХ/(ФЕА +ФІ+ФС)	$0,15 \pm 0,03$	$0,64 \pm 0,06^*$	$0,42 \pm 0,08^*$
ФХ / ФС	$1,39 \pm 0,15$	$2,98 \pm 0,24^*$	$11,38 \pm 0,31^*$
ФЕА / ФС	$7,49 \pm 0,28$	$2,72 \pm 0,17^*$	$25,02 \pm 0,39^*$
СМ / ФХ	$0,51 \pm 0,05$	$0,32 \pm 0,07^*$	$0,64 \pm 0,05^*$
Щука			
ФХ/(ФЕА +ФІ+ФС)	$0,22 \pm 0,04$	$0,06 \pm 0,01^*$	$0,16 \pm 0,01^*$
ФХ / ФС	$2,69 \pm 0,18$	$1,61 \pm 0,12^*$	$2,21 \pm 0,16^*$
ФЕА / ФС	$10,80 \pm 0,25$	$23,69 \pm 0,24^*$	$25,77 \pm 0,22^*$
СМ / ФХ	$0,67 \pm 0,07$	$0,46 \pm 0,04^*$	$0,34 \pm 0,03^*$

Таким чином, одержані співвідношення окремих фракцій фосфоліпідів підтверджують описані вище перебудови клітинної мембрани. Так, за дії 0,2 та 0,5 мг/дм³ металу встановлено вірогідне збільшення співвідношення $[ФХ/(ФЕА+ФІ+ФС)]$ у клітинах гепатопанкреасу коропа, що, відповідно, вказує на збільшення частки ліпідів зовнішнього шару мембрани. Подібна асиметрія розміщення фосфоліпідів сприяє модуляції проникності біомембрани. Дозозалежне зростання величин показників $ФХ/ФС$ і $ФЕА/ФС$ підтверджує інтенсифікацію синтезу фосфатидилхоліну з його попередників – фосфатидилетаноламіну і фосфатидилсерину.

Зниження співвідношення $СМ/ФХ$ у риб, аклімованих до впливу 0,2 мг/дм³ Феруму, обумовлене достовірним накопиченням фосфатидилхоліну та незначним достовірним зростанням кількості $СМ$, порівняно з контрольними значеннями.

За впливу підвищених концентрацій металу на гепатопанкреас щуки відмічається зворотній характер змін розрахованих співвідношень. Вірогідне зниження співвідношення $[ФХ/(ФЕА+ФІ+ФС)]$ в щуки вказує на накопичення фосфоліпідів внутрішнього шару мембрани, що сприяє збільшенню мікров'язкості мембрани.

Зниження показника $ФХ/ФС$ та зростання співвідношення $ФЕА/ФС$ ($p < 0,05$) підтверджує інгібування синтезу фосфатидилхоліну та, відповідно, інтенсифікацію продукування фосфатидилетаноламіну за участю фосфатидилсериндекарбоксилази.

Зниження співвідношення $СМ/ФХ$ в гепатоцитах щуки, ймовірно, обумовлене інтенсивним зниженням вмісту як одного, так і іншого $ФЛ$ і вказує на перерозподіл фракцій фосфоліпідів зовнішнього шару мембрани.

Характер кількісних співвідношень окремих фракцій фосфоліпідів у нирках риб за дії Феруму (III) має низку спільних ознак з тканинами зябер та печінки (рис. 6.13, 6.14).

За дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ металу в нирках коропа встановлено достовірне збільшення вмісту ФХ у 1,24 раза та зниження у 1,33 раза концентрації ЛФХ. Такі зміни вказують на активацію цими концентраціями Феруму анаболічних перетворень.

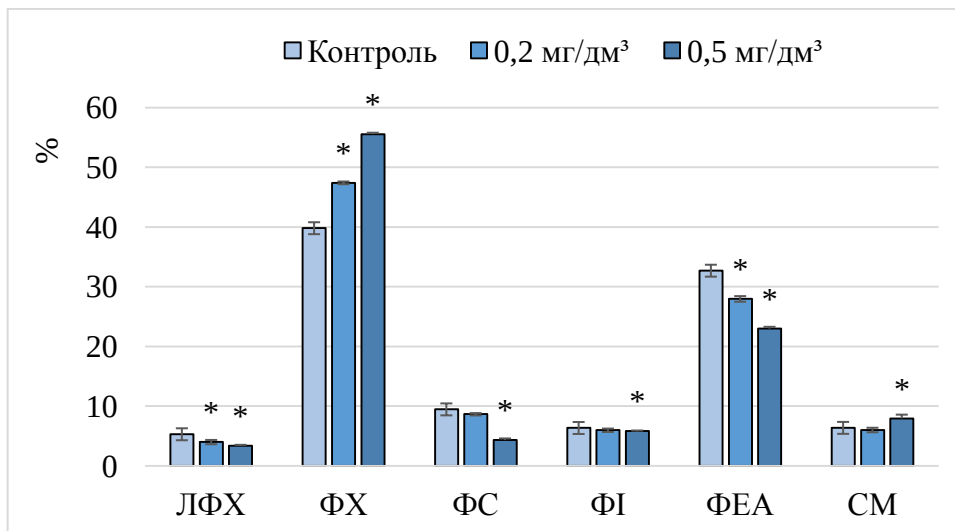


Рис. 6.13. Співвідношення фракцій фосфоліпідів в клітинах нирок коропа за дії іонів Феруму ($M \pm m$, $n=5$).

Синтез фосфатидилхоліну, ймовірно, проходить з фосфатидилетаноламіну внаслідок активації метилтрансфераз [250], що підтверджується достовірним зниження останнього у 1,17 раза. Такі зміни сприяють зростанням регуляції проникності біліпідного шару клітинної мембрани для іонів металів [149].

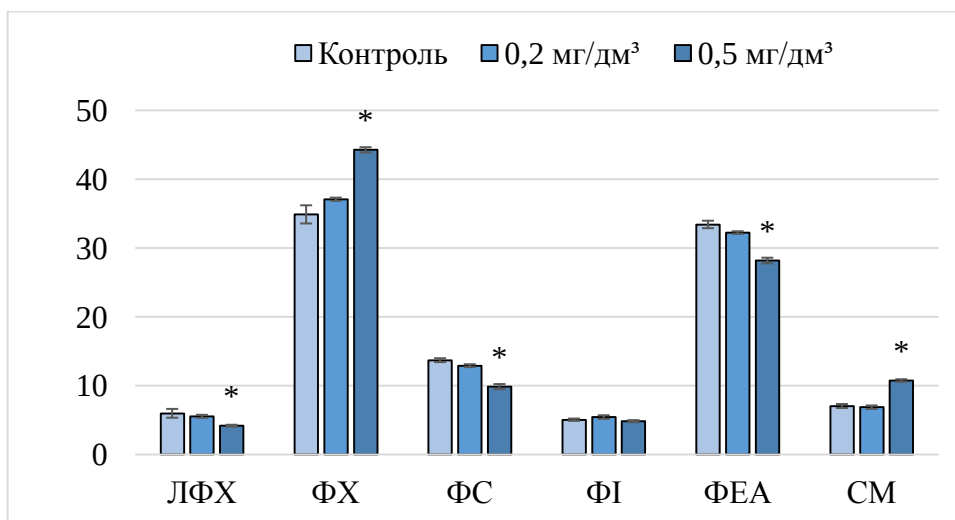


Рис. 6.14. Співвідношення фракцій фосфоліпідів в клітинах нирок щуки за дії іонів Феруму ($M \pm m$, $n=5$).

Натомість дія $0,5 \text{ мг/дм}^3 \text{ Fe}^{3+}$ індукувала схожі зміни фосфоліпідного спектру у клітинах нирок обох досліджуваних видів риб. Так, встановлено зростання вмісту ФХ, що може бути пов'язано з активацією його синтезу з фосфатидилетаноламіну за участю метилтрансфераз [176], підтвердженням цього припущення є достовірне зниження вмісту останнього у досліджуваній тканині риб. Достовірне зниження ФС, ймовірно, є наслідком зниження вмісту ФЕА, адже цей фосфоліпід бере участь у анаплеротичному шляху відновлення пулу фосфатидилетаноламіну [182].

Накопичення СМ, ймовірно, є наслідком активації перетворення ФХ у СМ за участю церамідхолінфосфотрансферази [182]. Такі зміни сприяють ущільненню мембрани та, відповідно, зменшенню її проникності для іонів металу [149].

Оцінку біологічних змін фосфоліпідного спектру здійснили на основі коефіцієнтів відношення вмісту фракцій цих фосфоліпідів (табл. 6.4).

Таблиця 6.4.

Вплив іонів Феруму на співвідношення різних фракцій
фосфоліпідів в клітинах нирок риб

Досліджувані показники	Контроль	$0,2 \text{ мг/дм}^3$	$0,5 \text{ мг/дм}^3$
Короп			
ФХ/(ФЕА +ФІ+ФС)	$0,82 \pm 0,06$	$1,11 \pm 0,08^*$	$1,68 \pm 0,10^*$
ФХ / ФС	$4,21 \pm 0,18$	$3,48 \pm 0,14^*$	$12,85 \pm 0,26^*$
ФЕА / ФС	$3,45 \pm 0,21$	$3,23 \pm 0,11$	$5,32 \pm 0,09^*$
СМ / ФХ	$0,16 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,02$
Щука			
ФХ/(ФЕА +ФІ+ФС)	$0,67 \pm 0,08$	$0,72 \pm 0,06$	$1,03 \pm 0,07^*$
ФХ / ФС	$2,55 \pm 0,12$	$2,88 \pm 0,14$	$4,49 \pm 0,16^*$
ФЕА / ФС	$2,44 \pm 0,15$	$2,50 \pm 0,11$	$2,86 \pm 0,12$
СМ / ФХ	$0,20 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,03$

Результати розрахованих співвідношень підтверджують тенденцію до активації синтезу фосфоліпідів у клітинах нирок риб. Так, за дії обох концентрацій іонів Феруму в коропа та за впливу $0,5 \text{ мг/дм}^3$ у щуки встановлено вірогідне зростання величини показника $[\text{ФХ}/(\text{ФЕА}+\text{ФС}+\text{ФІ})]$, що вказує на перебудову ліпідного метаболізму у бік накопичення фосфоліпідів зовнішнього шару мембрани. Опосередкованим підтвердженням таких змін є збільшення співвідношення $\text{ФХ}/\text{ФС}$ та $\text{ФЕА}/\text{ФС}$.

Така перебудова біліпідного шару, очевидно, дозволяє регулювати проникність клітинної мембрани.

Також можна відзначити відсутність вірогідних змін співвідношення $\text{СМ}/\text{ФХ}$ у нирках обох видів риб, аклімованих до дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ металу, хоча кількісні зміни фракції СМ встановлені. Це може бути обумовлено підтриманням відповідної в'язкості біліпідного шару, у зв'язку з накопиченням ФХ [149].

Аналіз кількісних співвідношень окремих класів фосфоліпідів у м'язах риб показав, що вплив Феруму викликає менш відчутні зміни ліпідного складу, порівняно з тканинами зябер та печінки, проте, слід відзначити пропорційність змін фосфоліпідного профілю до кількості металу у воді. Також варто відзначити видоспецифічність цих змін, що, можливо, є результатом різних кількостей накопичення Феруму у цій тканині [50].

Так, у м'язах коропа спостерігається дозозалежний процес гідролізу ФЛ (рис. 6.15, 6.16), на що вказує вірогідне зниження вмісту ФХ . Такі зміни вмісту цього фосфоліпиду, ймовірно, обумовлені активацією іонами металу фосфоліпази A_2 [101, 185]. Це підтверджується достовірним накопиченням ЛФХ .

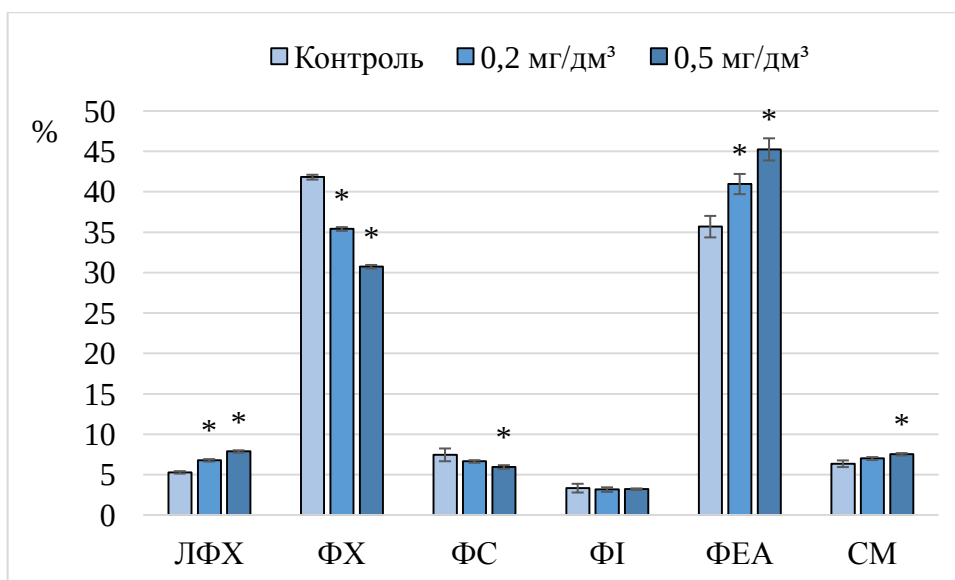


Рис. 6.15. Співвідношення фракцій фосфоліпідів в м'язах коропа за дії іонів Феруму ($M \pm m$, $n=5$).

Ймовірно, отримані показники пов'язані як із активацією ферментативної деградації ФХ, так і з інгібуванням іонами Феруму і основного шляху його синтезу [176], чим можна пояснити зростання вмісту фосфатидилетаноламіну ($p < 0,05$).

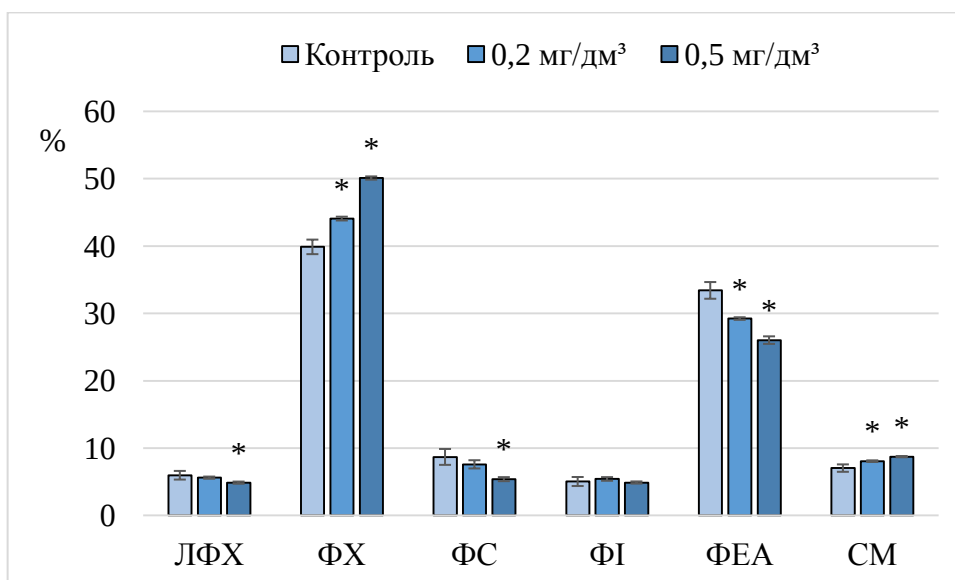


Рис. 6.16. Співвідношення фракцій фосфоліпідів в м'язах щуки за дії іонів Феруму ($M \pm m$, $n=5$).

Зміни вмісту, ймовірно, є наслідком активації фосфатидилсериндекарбоксилази, яка каталізує перетворення $ФС \rightarrow ФЕА$ [68], чим і обумовлюється вірогідне накопичення останнього у м'язах коропа.

Загальна тенденція до збільшення вмісту сфінгомієліну у складі клітин м'язів риби, ймовірно, є результатом активації іонами металу перетворення ФХ у СМ за участю церамідхолінфосфотратсфери [195], що забезпечує ущільнення мембрани та зниження її проникності [111].

Натомість у м'язах щуки спостерігається зворотній характер змін фосфоліпідного профілю. Так, за експозиції обох концентрацій металу вміст ФХ вірогідно зріс, тоді як кількість ФЕА знизилася, що, ймовірно, є наслідком інтенсифікації синтезу холін-вмісного ліпиду за участю метилтрансфераз. Опосередкованим підтвердженням активації синтезу фосфатидилхоліну в біліпідному шарі м'язів риби є зниження вмісту лізофосфатидилхоліну ($p < 0,05$) [185].

Зменшення вмісту фосфатидилсерину ($p < 0,05$), ймовірно, спричинене активацією фосфатидилсериндекарбоксилази, що сприяє поповненню пулу фосфатидилетаноламіну. Накопичення іншого холін-вмісного ФЛ, ймовірно, є наслідком активації перетворення ФХ за участю церамідхолінфосфотратсфери.

Оцінку біологічних змін фосфоліпідного спектру здійснили на підставі коефіцієнтів відношення вмісту фракцій цих фосфоліпідів (табл. 6.5).

Так, у м'язах коропа відмічається зниження показника $[ФХ/(ФЕА+ФС+ФІ)]$, що, ймовірно, є наслідком деструкції зовнішнього біліпідного шару мембрани.

З іншого боку такі зміни можна розглядати як адаптивну відповідь на дію токсиканту, адже відомо, що накопичення фосфоліпідів внутрішнього шару мембрани сприяє збільшенню її мікров'язкості та зниженню проникності для іонів металів. Така перебудова біліпідного шару, очевидно, дозволяє регулювати проникність клітинної мембрани.

Таблиця 6.5.

Вплив іонів Феруму на співвідношення різних фракцій
фосфоліпідів в м'язах риб

Досліджувані показники	Контроль	0,2 мг/дм ³	0,5 мг/дм ³
Короп			
ФХ/(ФЕА +ФІ+ФС)	0,89 ± 0,05	0,69 ± 0,05*	0,56 ± 0,08*
ФХ / ФС	5,61 ± 0,13	5,32 ± 0,19	5,16 ± 0,21
ФЕА / ФС	4,78 ± 0,26	6,16 ± 0,17*	7,59 ± 0,29*
СМ / ФХ	0,15 ± 0,02	0,20 ± 0,02*	0,24 ± 0,03*
Щука			
ФХ/(ФЕА +ФІ+ФС)	0,84 ± 0,05	1,04 ± 0,13*	1,38 ± 0,17*
ФХ / ФС	4,64 ± 0,09	5,80 ± 0,18*	9,29 ± 0,26*
ФЕА / ФС	3,84 ± 0,17	3,85 ± 0,22	4,83 ± 0,16*
СМ / ФХ	0,18 ± 0,03	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,03

У зазначеній тканині риб спостерігається загальна тенденція до зростання співвідношення ФЕА/ФС, що вказує на активацію перетворення фосфатидилсерину у фосфатидилетаноламін, внаслідок його декарбоксілювання.

Загальна тенденція до зростання співвідношення СМ/ФХ вказує на інтенсифікацію перетворення ФХ у СМ за участю церамідхолінфосфотрансферази, що сприяє збільшенню мікрров'язкості біліпідного шару та обмеженню надходження іонів металу у м'язи.

Щодо зміни співвідношень фракцій фосфоліпідів м'язів щуки, то результати розрахованих показників підтверджують тенденцію до активації синтезу фосфоліпідів. Так, встановлено вірогідне зростання величини показника $[ФХ/(ФЕА+ФС+ФІ)]$, що вказує на перебудову ліпідного метаболізму у бік накопичення фосфоліпідів зовнішнього шару

мембрани. Опосередкованим підтвердженням таких змін є збільшення співвідношення ФХ/ФС та ФЕА/ФС.

Також можна відзначити відсутність вірогідних змін співвідношення СМ/ФХ у досліджуваній тканині щуки. Це може бути обумовлено підтриманням відповідної в'язкості біліпідного шару, у зв'язку з накопиченням ФХ [149].

Таким, чином, зміни фосфоліпідного спектру досліджуваних тканин коропа та щуки спрямовані на зменшення плинності біологічних мембран та зниження їх проникності для Феруму (ІІІ).

6.3. Вміст продуктів вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів у зябрах та печінці коропа за дії Феруму (ІІІ) у воді

У процесі аеробного метаболізму у тканинах тварин утворюються активні форми кисню (АФК), що є проміжними продуктами неповного відновлення кисню в дихальному ланцюзі [120, 193].

Основним мішенями для АФК (супероксид аніонрадикал, гідроген пероксид, гідроксильний радикал) є поліненасичені жирні кислоти. Перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) – типовий вільнорадикальний процес один з найважливіших окисних процесів в аеробних організмів, у тому числі і риб.

Проте за дії стресових чинників різного генезису (радіація, температурний стрес, пестециди, важкі метали тощо), коли продукуються додактові кількості АФК, ПОЛ є основною причиною пошкодження ліпідів мембран [91, 138, 190].

Механізми атиоксидантного захисту у риб включають ферментні системи і низькомолекулярні антиоксиданти, подібні до тих, що існують у ссавців [123]. Продуктами перекисного окиснення є дієнові кон'югати, гідроперекиси, окси-, кетокислоти та низка інших сполук. За їх кількістю можна судити про інтенсивність вільнорадикального перекисного

окиснення у різних біологічних системах організму, що робить можливим використання їх як фізіолого-біохімічні маркери [54].

Баланс між прооксидантними екзогенними чинниками (тобто забруднювачами навколишнього середовища) та антиоксидантним захистом (ферментативний і неензиматичний) у біологічних системах може бути використаний для оцінки токсичних ефектів за стресових ситуацій, спричинених різними групами хімічних забруднювачів у тому числі і перехідних металів [201]. Збільшення рівня активних форм кисню призводять до окисного пошкодження, включаючи перекисне окислення ліпідів, окиснення білків та ДНК, а також інактивацію ферментів. Компоненти антиоксидантного захисту використовуються як біохімічні маркери окислювального стресу [193].

Перехідні метали, в тому числі і Ферум, індукують окисний стрес у прісноводних риб. Надмірне поглинання металу або порушення його регуляції може бути токсичним, що пов'язано з його здатністю індукувати утворення АФК через реакцію Фентона, за допомогою якої Ферум (II) окиснюється гідроген пероксидом до трьохвалентного стану, гідроксильного радикалу і гідроксильного аніону [198, 259].

Тому оцінка окисного пошкодження та систем захисту від АФК в організмі риб об'єктивно відображає забруднення водних екосистем металами [187].

Враховуючи вище сказане, в цьому розділі нашої роботи ми досліджували вплив іонів Fe^{3+} на вміст окремих продуктів перекисного окиснення та активність антиоксидантних ферментів, які є важливими індикаторами окисного стресу в тканинах коропа та щуки.

Дієнові кон'югати є первинними продуктами ПОЛ, що відносяться до токсичних метаболітів, які можуть здійснювати шкодочинну дію на ліпопротеїди, білки, ферменти та нуклеїнові кислоти [201]. Аналіз отриманих результатів показав, що вміст дієнових кон'югатів у печінці коропа за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Феруму (III) зростав у 1,2 рази ($p < 0,05$), тоді

як за впливу $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу достовірних відмінностей щодо контролю відмічено не було (рис. 6.17). У зябровій тканині коропа мало місце пропорційне до концентрації іонів Fe^{3+} зростання кількості дієнових кон'югатів у 1,8 та 2,1 рази відповідно. Це свідчить про активацію процесів пероксидації ліпідів.

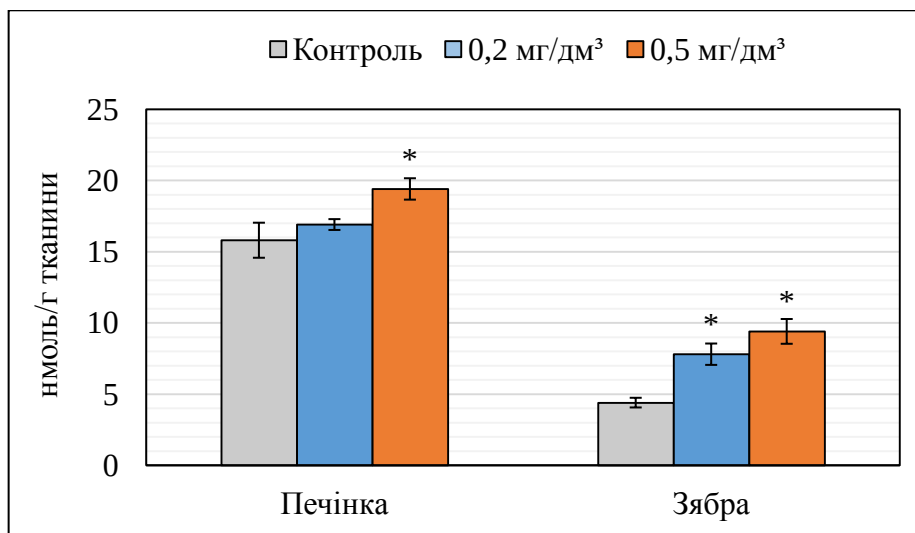


Рис. 6.17 Вміст дієнових кон'югатів у тканинах коропа за різного вмісту іонів Fe^{3+} у воді ($M \pm m$, $n=5$).

У печінці щуки було відмічено подібну до коропа динаміку змін кількості дієнових кон'югатів (рис. 6.18). Так, за впливу $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів феруму мало місце зростання вмісту ДК у печінці щуки в 1,4 рази, а за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} у 1,6 рази ($p < 0,05$).

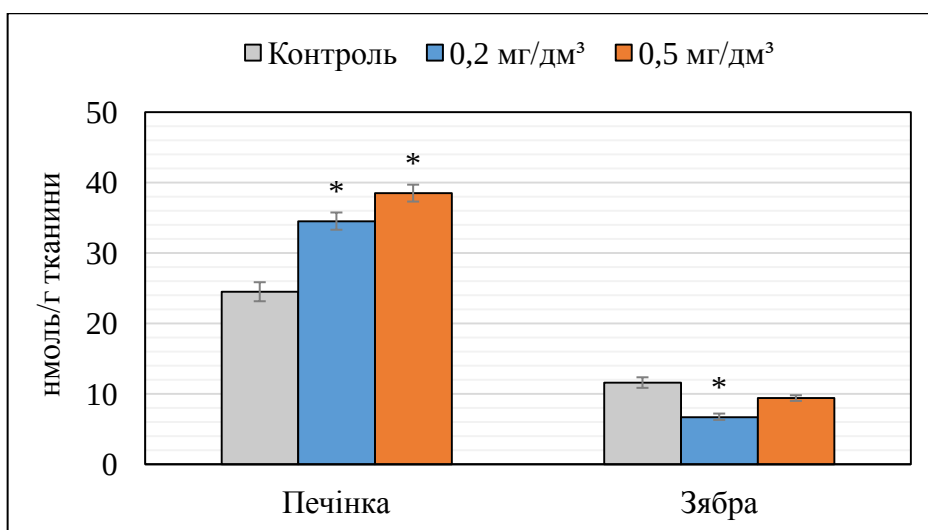


Рис. 6.18. Вміст дієнових кон'югатів у тканинах щуки за різного вмісту іонів Fe^{3+} у воді ($M \pm m$, $n=5$).

У зябрах щуки за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу було відмічено достовірне зниження концентрації дієнових кон'югатів у 1,7 рази, тоді як за впливу $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} вміст досліджуваних метаболітів не відрізнявся від контрольних значень.

Гідропероксиди ліпідів, як і дієнові кон'югати, є первинними продуктами ПОЛ. Аналіз вмісту гідропероксидів ліпідів за впливу підвищених концентрацій іонів Феруму (III) показує яскраво виражений видовий та тканинний характер змін (рис. 6.19 – 6.20). Так, максимальна з досліджуваних концентрацій іонів металу викликала зростання рівня гідропероксидів ліпідів у 1,5 рази в печінці та у 1,2 рази у зябровому апараті коропа відносно контрольних значень ($p < 0,05$).

За впливу $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} зміни вмісту відмічено лише в зябрах коропа, де спостерігалось достовірне зниження вмісту гідропероксидів у 2,1 рази. При цьому у печінці коропа за даної концентрації іонів металу спостерігалася тенденція до зниження кількості гідропероксидів ліпідів.

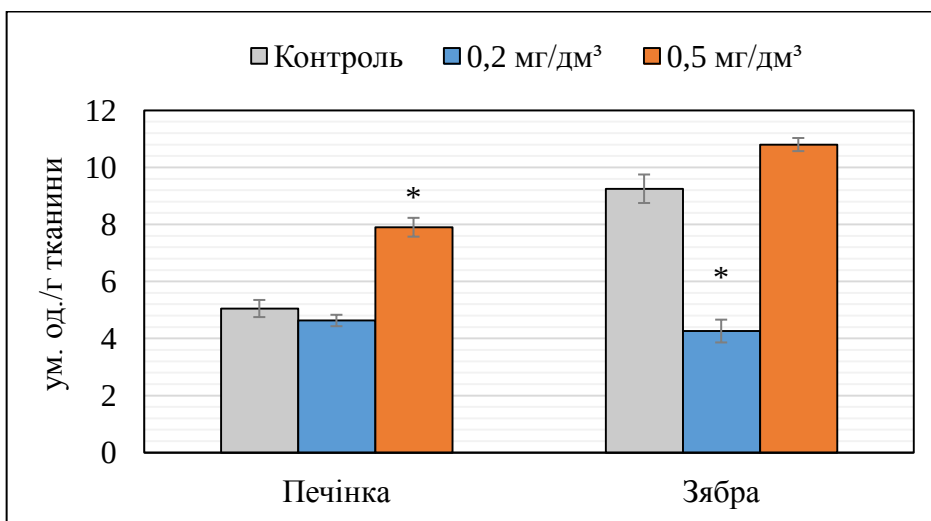


Рис. 6.19. Вміст гідропероксидів ліпідів у тканинах коропа за різного вмісту іонів Fe^{3+} у воді ($M \pm m$, $n=5$).

На відміну від коропа в печінці щуки мало місце достовірне зниження гідропероксидів ліпідів у 1,3 рази лише за впливу $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} (рис. 6.20).

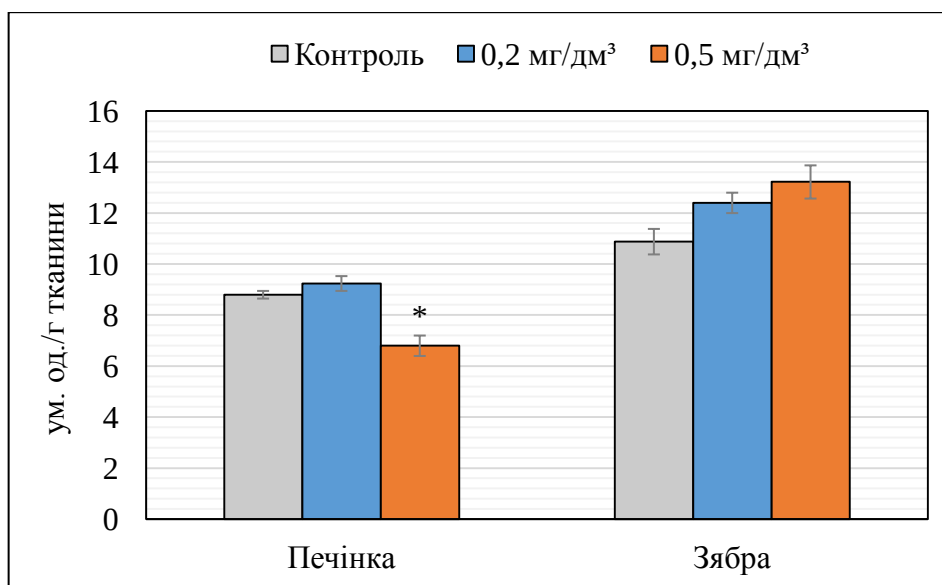


Рис. 6.20. Вміст гідропероксидів ліпідів у тканинах щуки за різного вмісту іонів Fe^{3+} у воді ($M \pm m$, $n=5$).

У зябрах щуки спостерігалось зростання вмісту гідропероксидів ліпідів у 1,1 та 1,2 рази за впливу 0,2 та 0,5 мг/дм³ іонів металу щодо контролю відповідно. Зростання кількості гідропероксидів ліпідів у зябрах обох видів риб за впливу 0,5 мг/дм³ іонів Fe^{3+} є свідченням посилення пероксидації ліпідів, що очевидно пов'язано із значним акумулюванням Феруму у тканинах зябер досліджуваних видів риб (див. табл. 3.1 – 3.2).

Окислювальний стрес виникає, коли швидкість продукування АФК перевищує швидкість їх утилізації та відновлення біомолекул [256].

Отже, спостерігається зростання вмісту цих метаболітів у зябрах коропа та щуки за дії 0,5 мг/дм³ іонів Fe^{3+} , що може бути свідченням окисного стресу в їх організмі.

Одним із вторинних продуктів ПОЛ є малоновий диальдегід, який може утворюватися з гідропероксидів [2]. Негативна роль малонового диальдегіду полягає в тому, що він зшиває молекули ліпідів і знижує плинність мембрани. Підвищений вміст МДА у метаболічно активних тканинах може бути свідченням окисного стресу в організмі риб [126].

Аналіз отриманих результатів показав, що вміст малонового диальдегіду у печінці та зябрах коропа за впливу підвищених концентрацій

іонів Феруму достовірно не відрізняється від контрольних значень (рис. 6.21).

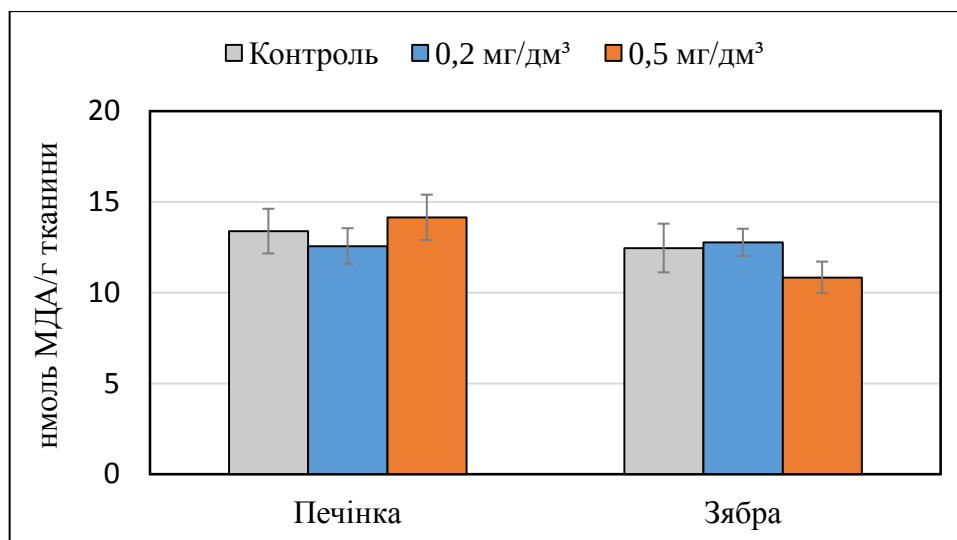


Рис. 6.21. Вміст МДА у тканинах коропа за різного вмісту іонів Fe^{3+} у воді ($M \pm m$, $n=5$).

На відміну від коропа у зябрах щуки має місце зменшення кількості малонового діальдегіду за дії 0,2 мг/дм³ іонів металу (рис. 6.22). За впливу 0,5 мг/дм³ іонів Fe^{3+} рівень даного метаболіту дещо зростає, однак не досягає контрольних значень. У печінці щуки достовірних змін щодо кількості МДА як за дії 0,2 мг/дм³, так і 0,5 мг/дм³ іонів Fe^{3+} не виявлено.

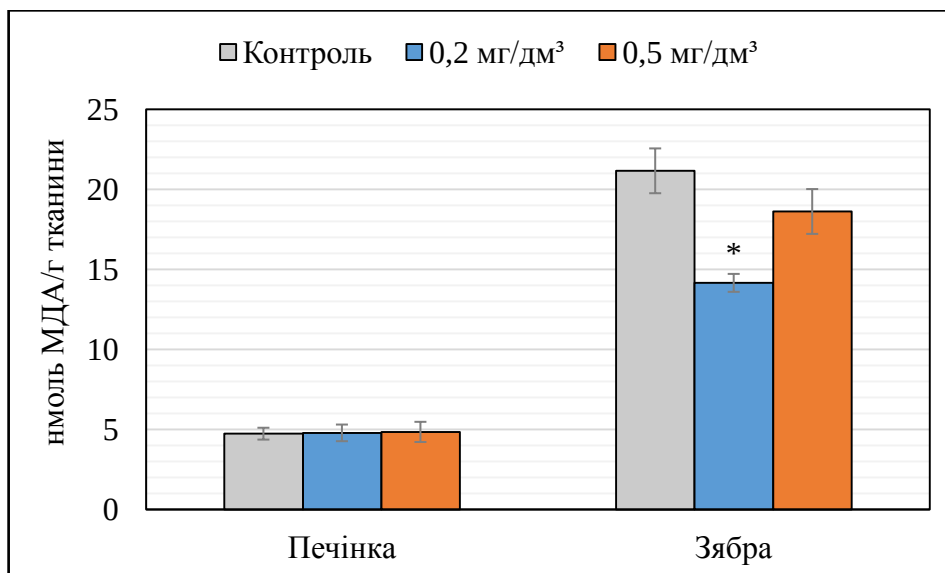


Рис. 6.22. Вміст МДА у тканинах щуки за різного вмісту іонів Fe^{3+} у воді ($M \pm m$, $n=5$).

Отже, в цілому іони Феруму здійснюють значний вплив на антиоксидантну систему організму риб. Ініціація вільнорадикального

окиснення та утворення його продуктів має індивідуальний характер для кожного виду риб, а також виражену тканинну специфіку. Високі концентрації іонів Fe^{3+} ($0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу) посилюють процеси перекисного окиснення ліпідів в зябрах та печінці риб, на що, в цілому, вказує підвищення вмісту дієнових кон'югатів та гідропероксидів ліпідів. Разом з тим, дія $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Феруму (III) здебільшого не викликала зростання вмісту активних форм кисню відносно контролю, що підтверджується відсутністю накопичення, а в окремих випадках зниженням кількості продуктів ПОЛ.

6.4. Активність каталази та супероксиддисмутази в тканинах риб за умов підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді

Дія деяких ксенобіотиків, включно металів, може призводити до утворення в організмі водних організмів додаткових кількостей високореакційних форм кисню та зниження активності антиоксидантних систем захисту [15, 201]. Ця ситуація ініціює окислювальний стрес у біологічних системах, що призводить до пошкодження тканин, процесів запалення та старіння організму [236].

Окисний стрес – результат дисбалансу між утворенням активних форм кисню та функціонуванням антиоксидантних систем організму риб [126, 206].

Взаємодія між АФК та антиоксидантними системами у аеробних організмів здійснюється серією внутрішньоклітинних антиоксидантних ферментів, що перехоплюють і інактивують оксигеновмісні радикали.

Важливу роль у знешкодженні АФК в організмі риб відіграють антиоксидантні ферменти – супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза та каталаза. Підвищена активність цих ензимів є індикатором наявності в організмі риб окисного стресу [255]. Разом з тим, синтез антиоксидантних ферментів у тканинах риб значною мірою залежить від вмісту у воді мікроелементів, які входять до їх складу [82].

Аналіз результатів активності ферментів системи антиоксидантного захисту риб за впливу підвищених концентрацій іонів Феруму (III) у воді показав виражену концентраційну та видову специфіку змін.

Так, за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} у воді активність каталази в печінці коропа знижується в 1,3 рази, тоді як вплив $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу призводив до зростання активності ензиму у 1,1 рази ($p < 0,05$; рис. 6.23).

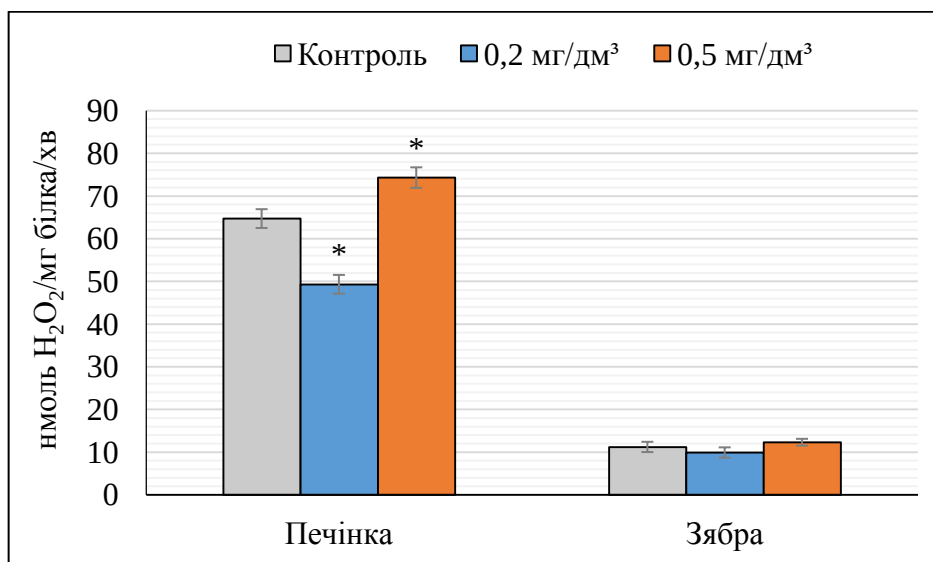


Рис. 6.23. Активність каталази в тканинах коропа за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді ($M \pm m$, $n=5$).

Зниження рівня активності каталази може бути пов'язано з прямою чи опосередкованою дією металу на структуру ферменту [105], депресією синтезу каталази [224] та, що найбільш ймовірно, гальмуванням ферментної активності супероксидними радикалами [97]. Сказане підтверджується зростанням активності СОД у печінці коропа за впливу підвищених концентрацій іонів Феруму (рис. 6.25).

У тканині зябрового апарату коропа за впливу підвищених концентрацій іонів Феруму (III) достовірних відмінностей у функціонуванні каталази дослідних та контрольної груп не було виявлено (рис. 6.23). Відмінності в реакціях ПОЛ окремих органів можуть бути обумовлені різними механізмами адаптації. Відомо, що при дії стресових чинників у метаболічно активних тканинах посилюється утворення ненасичених жирних кислот, а в тканині печінки на тлі зниження їх

загального рівня значно змінюється співвідношення окремих ненасичених жирних кислот [15].

У печінці щуки дія підвищених концентрацій іонів Феруму не призводила до достовірних змін активності каталази, проте як і в коропа відмічено тенденцію до незначного зниження активності ферменту за впливу $0,2 \text{ мг/дм}^3$ та зростання її за максимальної з досліджуваних концентрацій іонів металу (рис. 6.24).

У тканині зябер щуки було відмічено достовірне зростання активності каталази у 1,5 рази лише за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} . Підвищений рівень ферментної активності за впливу металів може бути свідченням окислювального стресу в організмі риби [177].

Слід відмітити, що зміни у функціонуванні каталази важко інтерпретувати. Як відмічено авторами [159] вплив важких металів викликає різновекторні модуляції у діяльності каталази залежно від виду гідробіонтів, часу експозиції, специфіки тканини тощо.

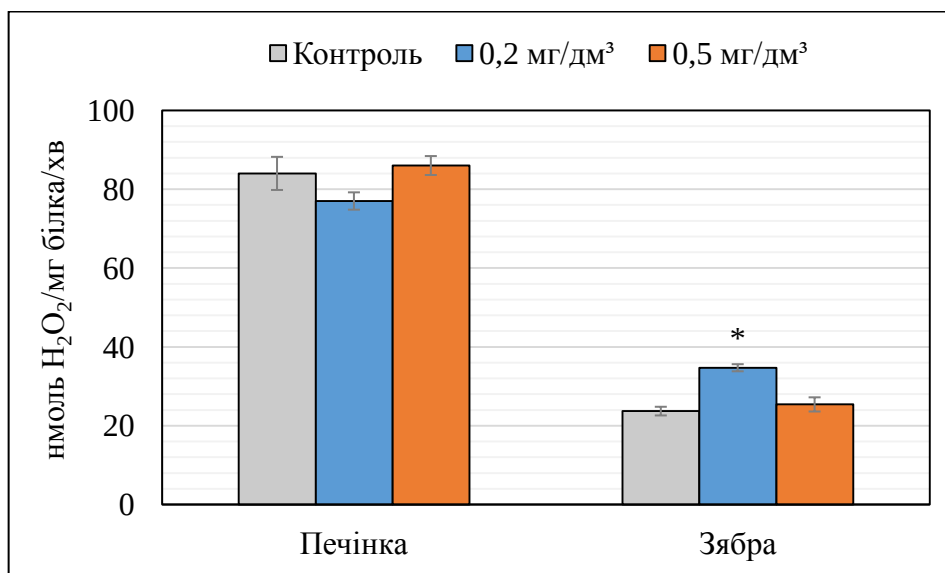


Рис. 6.24. Активність каталази в тканинах щуки за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді ($M \pm m$, $n=5$).

Супероксиддисмутаза тканин риби, згідно авторів [159], є специфічним біомаркером забруднення водного середовища сполуками Феруму і Меркурію. Метаболізм Феруму і супероксиду взаємопов'язані.

Підвищене продукування супероксид аніону збільшує виділення незв'язаного Феруму [135].

Аналіз функціональної активності СОД за впливу підвищених концентрацій іонів Феруму (III) показує виражену видову та тканинну специфіку змін. Так, в печінці як коропа, так і щуки достовірних змін в активності фермента відмічено не було, проте спостерігалася тенденція прямопропорційного до концентрації іонів металу у воді зростання активності СОД. У зябрах коропа було відмічено зростання у 1,2 рази активності СОД за дії 0,2 мг/дм³ іонів Fe³⁺, тоді як вплив 0,5 мг/дм³ призводив до зниження активності фермента до контрольних значень (рис. 6.25).

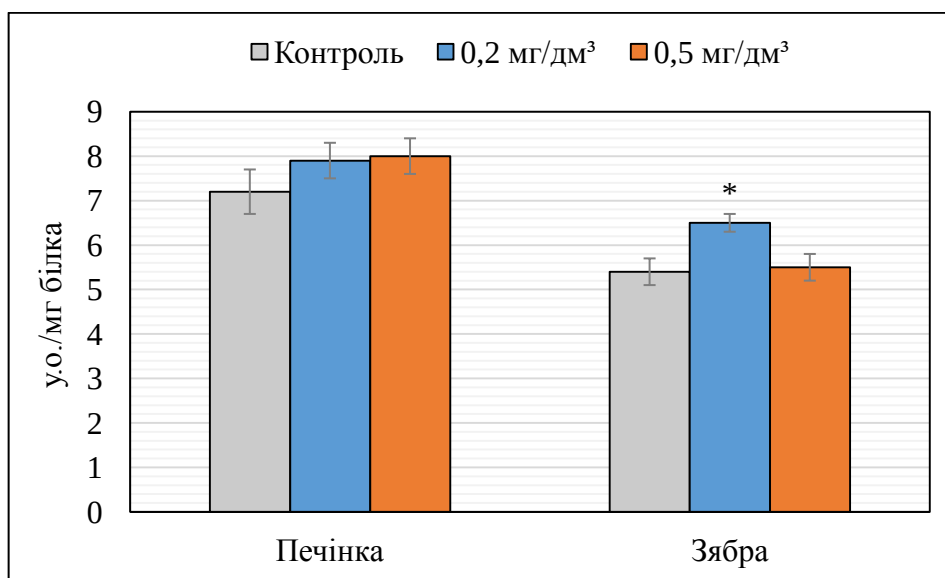


Рис. 6.25. Активність СОД у тканинах коропа за дії підвищених концентрацій іонів Fe³⁺ у воді ($M \pm m$, $n=5$).

Значне підвищення активності СОД та посилення пероксидації ліпідів було відмічено в еритроцитах цихлідових риб із забрудненої сполуками Феруму річки. При цьому найвищі показники активності ферменту були відмічені навесні, коли концентрація металу у воді було найбільшою [212].

На відміну від коропа у зябрах щуки має місце зниження активності СОД за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу та активація даного ензиму у 1,2 рази за умов наявності у воді $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Феруму (рис. 6.26).

У дослідженнях авторів [132], було відмічено дозозалежне гальмування активності СОД та збільшення продукування МДА у ембріонів медаки (*Oryzias latipes*) за дії нанозаліза. Разом з тим у дорослих риб із збільшенням часу експозиції активність СОД зростає.

Стимуляція активності супероксиддисмутази може бути адаптивною реакцією на збільшення кількості супероксидних радикалів у присутності перехідних металів [215].

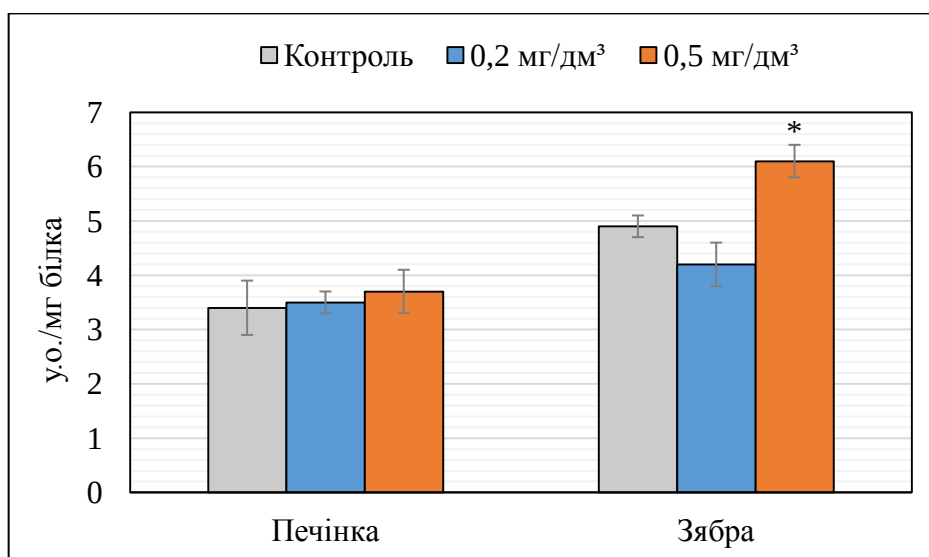


Рис. 6.26. Активність СОД у тканинах щуки за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді ($M \pm m$, $n=5$).

В цілому можна відмітити різну векторність змін активності ключових ензимів антиоксидантної системи риб за впливу підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} . Так, активність каталази в печінці обох видів знижується за впливу $0,2 \text{ мг/дм}^3$ та зростає за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу. У тканинах зябер (за винятком щуки за впливу $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Феруму) достовірних змін у функціонуванні каталази відмічено не було.

Достовірні зміни у активності СОД були відмічені лише в зябровій тканині риб – зростання у коропа за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ та у щуки за впливу $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу. При цьому, слід відмітити видові та

концентраційні особливості ПОЛ у досліджуваних видів риб, що пов'язано з різною функціональною активністю тканин риб.

Висновки до розділу 6

Зміни вмісту ліпідів у тканинах риб за дії іонів Fe^{3+} визначаються концентрацією іонів металу в воді, різною активністю тканин та екологічними особливостями досліджених видів риб. Так, у зябрах обох видів риб за дії іонів Fe^{3+} знижується вміст холестеролу та показник відношення холестерол/фосфоліпіди. Зміни вмісту жирних кислот, моно-, ди- та триацилгліцеролів у клітинах зябер мають різну спрямованість та залежать від концентрації іонів металу у воді та виду риби. У печінці коропа та щуки вплив іонів Fe^{3+} призводив до порушення синтезу холестеролу і фосфоліпідів та посилення ліполітичних процесів. У нирках риби за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} відмічено активацію катаболічних процесів. Відмічено активне використання ліпідних резервів м'язів риби для енергетичного забезпечення гомеостазу Феруму в організмі коропа за дії іонів Fe^{3+} , на що вказує зменшення кількості триацилгліцеролів та зростання кількості продуктів їх гідролізу.

Вплив підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді викликає активацію ліполізу у тканинах печінки та зябер досліджуваних видів риби, про що свідчить зростання вмісту лізофосфатидилхоліну та зменшення – фосфатидилхоліну, фосфатидилсерину і фосфатидилінозиту. Зміни вмісту полярних ліпідів у печінці та зябрах риби за дії іонів Fe^{3+} є видоспецифічними та визначаються їх концентрацією у воді.

В цілому модуляція ліпідного спектру тканин риби спрямована на забезпечення структурно-функціональної активності біологічних мембран з метою регулювання надходження і виведення Феруму з організму риби та підтримання енергетичного статусу їх організму для протидії токсичному чиннику.

Ініціація вільнорадикального окиснення і утворення його продуктів має індивідуальний характер для кожного виду риб та виражену тканинну специфіку. У зябрах риб при невисокій концентрації Феруму ($0,2 \text{ мг/дм}^3$) антиоксидантна система значною мірою інактивує вільні радикали, про що свідчить в цілому зростання активності досліджуваних ферментів та зниження кількості продуктів ПОЛ. При цьому у коропа ключову роль у знешкодженні АФК відіграє СОД, а у щуки каталаза, про що свідчить зростання їх активності у тканинах зябер. Високі концентрації іонів Fe^{3+} ($0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу) посилюють процеси перекисного окиснення ліпідів в зябрах та печінці риб, на що, в цілому, вказує підвищення вмісту дієнових кон'югатів та гідропероксидів ліпідів.

Слід відзначити відносну збалансованість процесів ПОЛ та антиоксидантного захисту в організмі риб за умов підвищених концентрацій іонів Феруму у воді.

За результатами представленими в розділі 6, опубліковані наступні роботи:

1. Рабченюк О.О., Хоменчук В.О., Далєвський В.М., Курант В.З. Вплив підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} на вміст фосфоліпідів в окремих тканинах прісноводних риб. *Сучасні проблеми теоретичної і практичної іхтіології* : мат. IX Міжнар. іхтіологічної науково-практич. конф., 14–16 вересня 2016 р. Одеса : ТЕС, 2016. С. 221–224.
2. Рабченюк О., Хоменчук В., Гладюк М., Далєвський В., Курант В. Особливості ліпідного складу клітинних мембран печінки та зябер риб за дії іонів Fe^{3+} . *Актуальні проблеми сучасної біохімії* : мат. Міжнар. наукової конф., присвяченій до 100-річчя від Дня народження професора Бориса Федоровича Сухомлинова, 16–18 листопада 2016 р. Львів : Вісник Львівського університету. Серія біологічна, 2016. Випуск 73. С. 121.

3. Рабченюк О.О., Хоменчук В.О., Курант В.З., Грубінко В.В. Фосфоліпідний склад окремих тканин коропа та щуки за дії іонів Fe^{3+} . *Доповіді НАН України*. 2017. № 1. С. 97–102.
4. Рабченюк О.О., Луцик З.М., Хоменчук В.О., Курант В.З. Особливості ліпідного складу тканин печінки та зябер риб за дії підвищених концентрацій йонів Fe^{3+} . *Біологічні дослідження – 2017* : зб. наук. праць VIII Всеукр. науково-практич. конф. з міжнародною участю, 14–16 березня 2017 р. Житомир : ПП «Рута», 2017. С. 141–143.
5. Рабченюк О.О., Хоменчук В.О., Сенік Ю.І., Курант В.З. Ліпідний обмін в організмі коропа і щуки за дії йонів феруму (III). *Гідробіол. журн.* 2018. Т. 54, № 5. С. 71–80.
6. Хоменчук В.О., Рабченюк О.О., Станіславчук А.В., Курант В.З. Вільнорадикальне перекисне окиснення ліпідів у тканинах риб за дії Феруму (III). *Сучасні проблеми теоретичної та практичної іхтіології* : мат. XI Міжнар. іхтіологічної науково-практич. конф., 18–20 вересня 2018 р. Львів, 2018. С. 82–85.
7. Рабченюк О., Гудзь К., Гаврилюк Х., Хоменчук В., Курант В. Активність каталази та супероксиддисмутази в тканинах риб за дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у воді. *Розвиток сучасної освіти і науки: результати, проблеми, перспективи* : мат. V Міжнар. науково-практич. конф. Конін–Ужгород –Херсон –Кривий Ріг : Посвіт, 2018. С. 397–399.
8. Рабченюк О.О., Хоменчук В.О., Станіславчук Г.В., Згурська С.Б. Курант В.З. Особливості перекисного окиснення ліпідів риб за умов підвищених концентрацій йонів Fe^{3+} . *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія*. 2018. № 3–4 (74). С. 38–46.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Підвищені концентрації йонів металів у воді мають виражену токсичність і негативно впливають на системи органів гідробіонтів. Метали є посередниками активації генів стресових білків. Важкі метали гальмують функції структурних білків, ферментів та нуклеїнових кислот внаслідок формування комплексів металів. Окрім того, вони викликають морфологічні зміни, хромосомні аберації і призводять до порушень в імунній системі [157]. Токсичність важких металів для організму риб залежить від розчинності сполук металів, рН, окисно-відновного потенціалу, іонної сили води, здатності до комплексоутворення тощо. До організму риб метали переважно потрапляють через зябра, шлунково-кишковий тракт і поверхню тіла [234].

Важкі метали здійснюють токсичну дію на організм за такими основними механізмами:

- редокс-активні метали (Ферум, Купрум) містять неспарені електрони на d-орбіталях і здатні шляхом окисно-відновних циклічних реакцій утворювати вільні радикали, які пошкоджують білки, ліпіди, нуклеїнові кислоти;
- заміщення токсичним металом біогенного іону в активних центрах ферментів. Метали постійної валентності (Кадмій, Меркурій) змінюють структуру та функції сульфурвмісних метаболітів та ферментів [241];
- помилкові з'єднання основ нуклеотидів при реплікації, транскрипції, трансляції; так, важкі метали активують редокс-чутливі фактори транскрипції, такі як активатор білка 1 (AP-1), p53 та ядерний фактор- χ B (NF- χ B). Ці фактори транскрипції регулюють експресію генів репарації ДНК та індукції апоптозу, поділ і диференціювання клітин [259].

В більшості випадків токсичність металу визначається ступенем акумулювання металу в метаболічно-активних структурах риб [131, 205].

Загальними тенденціями, що визначають накопичення та трансформацію металів у риб є: тканинспецифічна локалізація клітин (їх морфологія, хімічний склад та мембранна активність); хімічна активність іону металу, особливо комплексоутворююча здатність зі структурними білками та низькомолекулярними метаболітами [242].

Аналіз тканинного біонакопичення та розподілу Феруму показав, що в нормі найбільший вміст металу в печінці, а найменший у м'язах. Кількість Феруму в досліджуваних тканинах обох видів риб можна показати такою схемою:

Печінка > Зябра > Нирки > М'язи

Проте накопичення металу за умови підвищених концентрації іонів Fe^{3+} мало місце лише в зябрах коропа та щуки.

Накопичення металів вище оптимального рівня в печінці, а також окремі фізіолого-біохімічні показники в даному органі риб є біомаркерними і можуть реально відображати хронічне отруєння металами [99].

Незважаючи на відсутність накопичення Феруму у тканинах печінки досліджуваних риб, дія підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} призводила до суттєвих змін у обміні білків та нуклеїнових кислот (рис. 1).

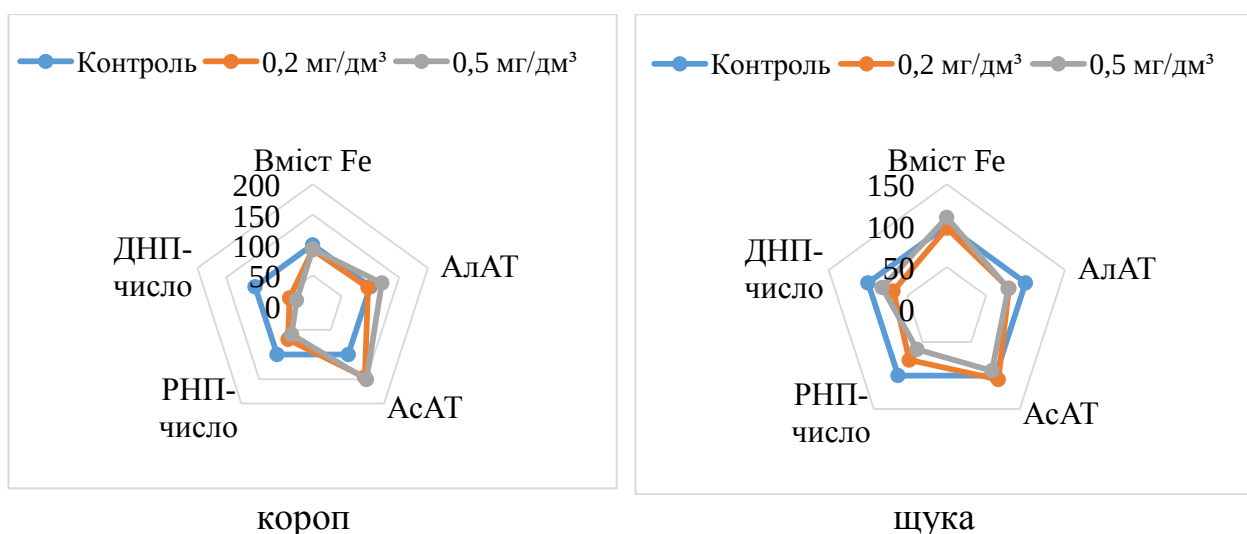


Рис. 1. Залежність між кількістю акумульованого металу, активностями АлАТ, АсАТ та числами метаболічної активності печінки риб (у % відносно контрольних значень).

Так, в цілому відмічено як для коропа, так і щуки, зростання активності процесів переамінування та зниження чисел метаболічної активності. Очевидно відбувається активна участь білкових резервів печінки в протидії токсичному чиннику.

Насамперед, це пов'язано з синтезом метал-зв'язуючих білків та енергетичним забезпеченням процесів детоксикації в організмі коропа та щуки.

Одним із механізмів токсичності перехідних металів, в тому числі і Феруму, полягає в тому, що вони можуть індукувати утворення надлишкових кількостей АФК спричиняючи окисний стрес у риб [211].

Порушення механізмів регуляції Феруму, а також його накопичення в тканинах риб може бути токсичним, що пов'язано з його здатністю індукувати утворення АФК через реакцію Фентона [206] та посилювати ПОЛ у риб. ПОЛ є основною причиною пошкодження ліпідів мембран.

З огляду на це, ми намагалися проаналізувати як пов'язані процеси пероксидації ліпідів з накопиченням Феруму в тканинах печінки та зябер риб. Як видно з узагальнюючої схеми (рис. 2), що підвищені концентрації у воді, хоча і не призводять до накопичення металу у печінці, індукують утворення проміжних метаболітів ПОЛ.

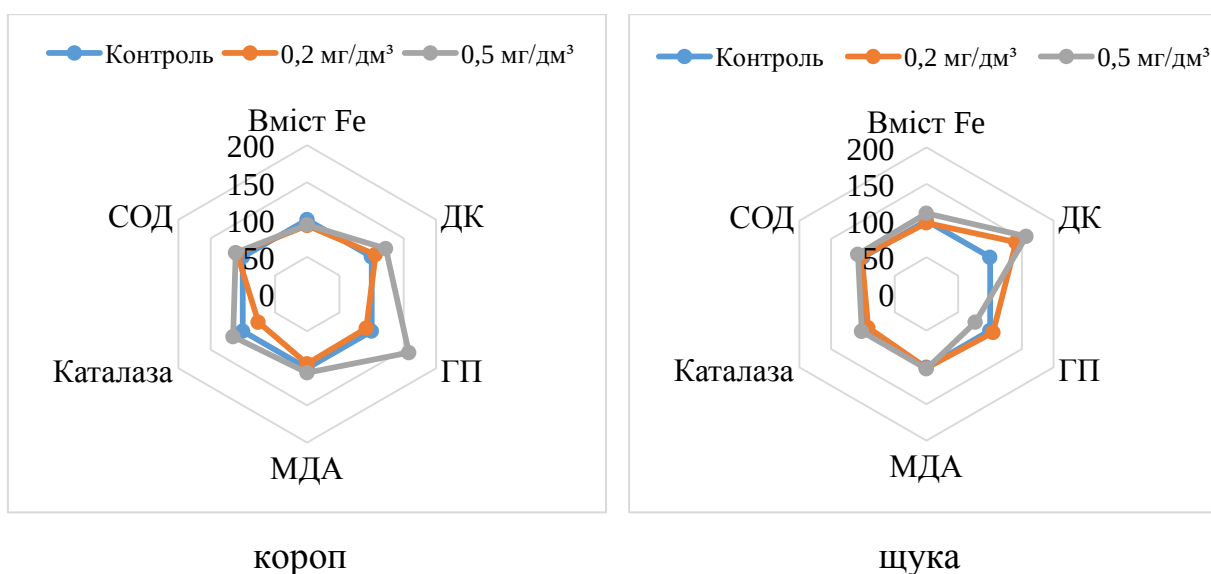


Рис. 2. Залежність між кількістю акумульованого металу та показниками ПОЛ в печінці риб (у % відносно контрольних значень).

Так, зростає кількість (особливо за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+}) дієнових кон'югатів, гідроперекисів ліпідів та активність каталази. Проте кількість МДА, який вважають біомаркерним показником окисного стресу та пероксидації ліпідів, практично не змінюється відносно контрольних значень.

Зябра риб є першочерговою мішенню токсикантів в силу свого межуючого розташування. Зовнішня поверхня зябер містить негативно заряджені сайти (ліганди), які забезпечують ефективне зв'язування позитивно заряджених катіонів металу [218]. Згідно авторів [159] підвищена кількість металів у зябрах риб часто відображає гостре отруєння металами, внаслідок їх високих концентрацій у водному середовищі.

Аналіз отриманих результатів показав, що на відміну від печінки, в зябрах обох видів риб відмічене дозозалежне акумулювання Феруму (рис. 3).

Зростання кількості акумульованого металу значною мірою корелює з показниками ПОЛ риб. Слід відмітити багатовекторність змін ПОЛ риб, що насамперед визначається видовими особливостями риби. Так, у коропа зростає кількість ДК та знижується вміст ГП, тоді як у щуки підвищені концентрації іонів Fe^{3+} викликають зворотні зміни.

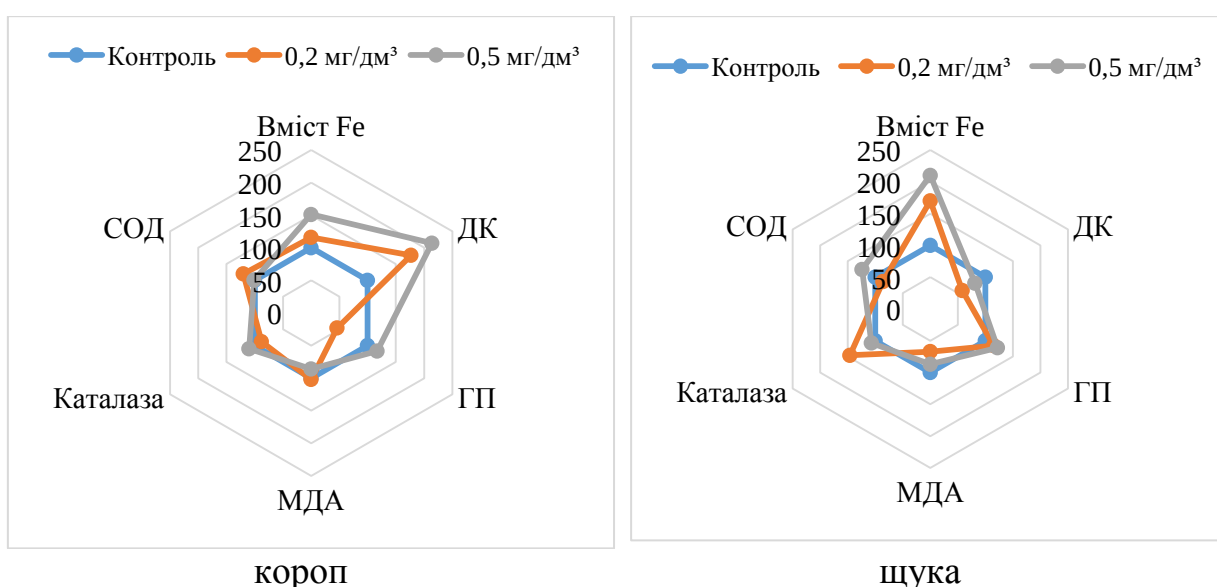


Рис. 3. Залежність між кількістю акумульованого металу та показниками ПОЛ в зябрах риби (у % відносно контрольних значень).

Разом з тим, не було відмічено достовірних змін вмісту МДА в зябрах контрольних та дослідних риб. В обох видів риб зазнають змін активності каталази та СОД, проте дані зміни, окрім видових особливостей, обумовлюється концентрацією іонів металу у воді (рис. 3).

Першочергову роль у знешкодженні АФК у коропа відіграє СОД, а у щуки – каталаза, про що свдчить зростання їх активності у тканинах зябер.

Показники крові риб можуть бути цінними біомаркерами інтоксикації їх організму важкими металами [239].

Ми проаналізували як корелюють між собою кількість накопиченого металу, активності ЛДГ, АсАТ та АлАТ в плазмі крові риб. Слід зазначити, що підвищені концентрації іонів Fe^{3+} у воді викликають зростання кількості металу у плазмі, що, в свою чергу, призводить до змін у функціонуванні досліджуваних ферментних систем (рис. 4). Насамперед, слід відмітити зростання активності ЛДГ в плазмі крові обох видів риб за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} . Активність трансаміназ в цілому зростає за впливу $0,2 \text{ мг/дм}^3$, тоді як дія високих концентрацій іонів Феруму переважно призводила до інгібування АлАТ та АсАТ у плазмі крові.

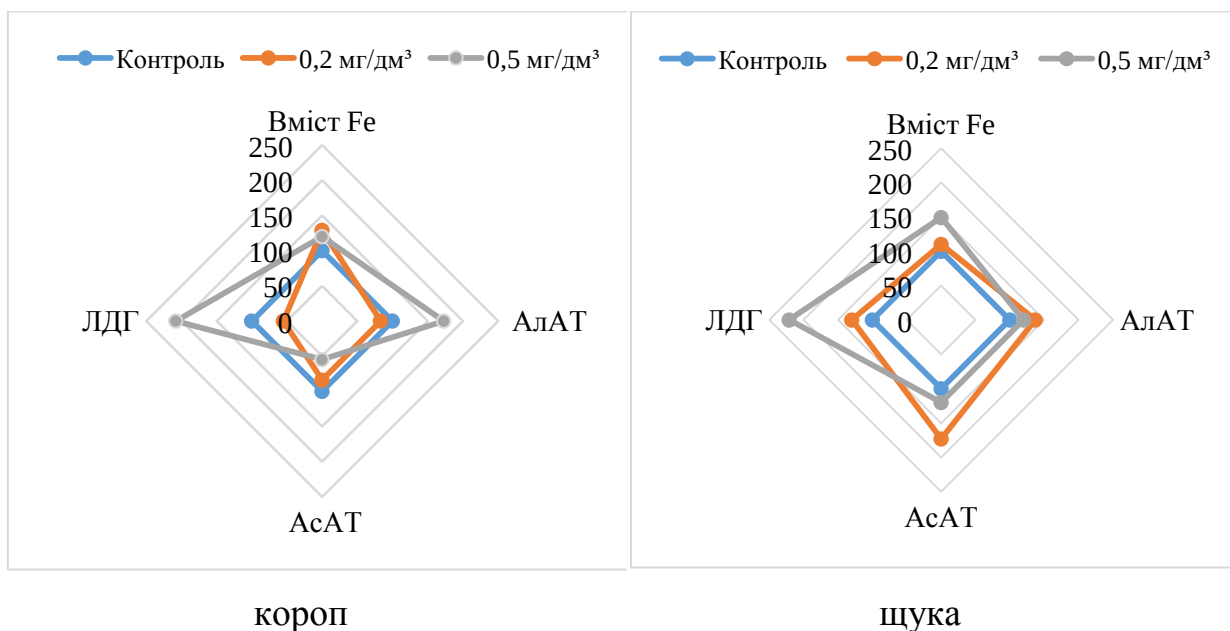


Рис. 4. Залежність між кількістю акумульованого металу та активностями АлАТ, АсАТ та ЛДГ плазмі крові риб (у % відносно контрольних значень).

Таким чином, накопичення металу та активності АлАТ, АсАТ, ЛДГ у плазмі крові риб можуть бути використані як біомаркери отруєння організму риб сполуками Феруму.

Для узагальнення та інтерпретації змін ліпідних компонентів досліджуваних тканин риб нами запропоновано узагальнюючі схеми дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} (рис. 5, 6).

За дії підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} у всіх досліджуваних тканинах щуки та у гепатопанкреасі і нирках коропа встановлено зниження кількості їх попередників – ДАГ, а зменшення вмісту МАГ і НЕЖК підтверджує активацію синтетичних перетворень у цих тканинах (рис. 5).

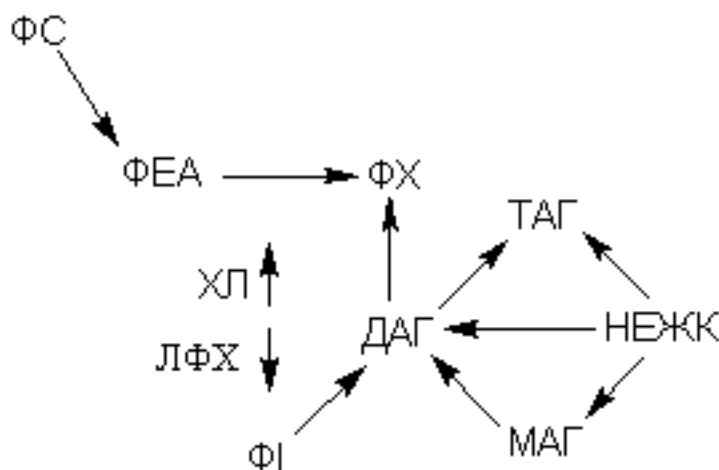


Рис. 5. Схема ліпідного обміну у всіх досліджуваних тканинах щуки та у печінці і нирках коропа аклімованих до впливу підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} .

Модифікацію фосфоліпідного складу тканин риб можна вважати адаптивною відповіддю на дію токсиканту, адже відомо, що транспорт металів через клітинні мембрани здійснюється за участю фосфоліпідів та залежить від їх складу і може модулюватися під впливом іонів металів [166]. Не менш важливим для розуміння цього процесу є той факт, що заряджені фосфоліпіди володіють високою сорбційною здатністю по відношенню до іонів металів [127], а також відомо про залежність між якісним і кількісним вмістом фосфоліпідів та активністю мембранних ферментів у клітинах тварин [175].

Загальна тенденція до зниження вмісту ТАГ може бути обумовлена як активацією деструкції біліпідного шару, так і активним використанням цих ліпідів як універсального джерела енергії, необхідної для пом'якшення токсичної дії іонів металу – забезпечення АТФ анаболічних перетворень [79]. Підтвердженням цього є зростання кількості фосфатидилхоліну та зниження продуктів його ферментативного гідролізу – ЛФХ і НЕЖК. Зменшення кількості ФС і ФЕА вказують на інтенсифікацію синтезу фосфатидилхоліну за участю метилтрансфераз [174].

Зниження вмісту ФІ, очевидно, пов'язана з активацією фосфоліпази С та фосфоліпази А₂, для якої цей фосфоліпід є неспецифічним субстратом [191].

Обидві дослідні концентрації Феруму у зябрах та м'язах коропа індукували зростання активності ліполізу, що виразилося у зниженні вмісту ФЛ та достовірному збільшенні кількості продуктів їх ферментативного гідролізу – НЕЖК, ДАГ та МАГ (рис. 6).

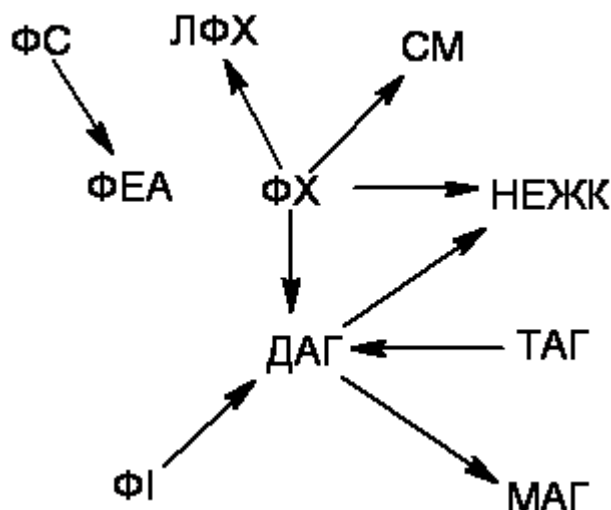


Рис. 6. Схема ліпідного обміну в зябрах та м'язах коропа аклімованих до впливу підвищених концентрацій іонів Fe^{3+}

Загальна тенденція до зниження вмісту ТАГ може бути обумовлена як активацією деструкції біліпідного шару, так і активним використанням цих ліпідів як універсального джерела енергії, необхідної для пом'якшення токсичної дії іонів металу [79].

Зниження вмісту ФХ, ймовірно, обумовлене активацією іонами металів фосфоліпази A_2 [185, 254], що підтверджується збільшенням кількості продуктів його ферментативного гідролізу – ЛФХ і НЕЖК.

Накопичення фосфатидилетаноламіну покликане обмежити надходження іонів металів через біомембрани внаслідок механічного збільшення її мікрров'язкості та, відповідно, зниження проникності [154]. Незважаючи на адаптивну роль ФЕА, значне його накопичення з одночасним гідролізом ФХ сприяє його появі на зовнішньому шарі мембрани, внаслідок чого спостерігається зростання її проникності [137]. Загальна тенденція до зниження кількості ФС, ймовірно, є наслідком активації його декарбоксилювання, що сприяє накопиченню ФЕА.

Активация синтезу СМ сприяє збільшенню мікрров'язкості біліпідного шару та, відповідно, обмеженню надходження іонів металу [154]. Також, такі зміни можна розглядати як компенсаторну реакцію на зростання активності фосфоліпази A_2 , бо відомо [185] про реципрокну залежність між вмістом сфінгомієліну та активністю цитоплазматичної фосфоліпази A_2 . Припускають, що інгібуючий ефект цього фосфоліпіду полягає у зміні мембранної структури [133].

Зниження вмісту ФІ, очевидно, пов'язане з активацією фосфоліпази С та фосфоліпази A_2 , для якої цей фосфоліпід є неспецифічним субстратом [191].

В загальному зміні ліпідного спектру досліджуваних тканин риб спрямовані на забезпечення структурно-функціональної активності ліпідного бішару мембран з метою регулювання надходження, зв'язування та екскреції Феруму з організму коропа і щуки та підтримання енергетичного статусу організму риб для протидії токсичному чиннику.

ВИСНОВКИ

На підставі дослідження закономірностей акумулювання Феруму і окремих показників білково-нуклеїнового та ліпідного обміну встановлено особливості формування адаптивної відповіді в організмі коропа і щуки на підвищення концентрації іонів Fe^{3+} у водному середовищі.

1. Накопичення Феруму тканинами риб залежить від концентрації металу у воді. За дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} вміст Феруму у зябрах коропа та щуки зростав у 1,5 і 2,1 рази відповідно. За цієї ж концентрації у нирках коропа кількість металу зменшувалась у 1,4 рази. Водночас у нирках щуки вміст Феруму знижувався в 1,5 рази за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу.
2. Підвищення концентрації іонів Fe^{3+} у воді впливає на накопичення інших металів в тканинах риб. У коропа концентрація $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу викликає перерозподіл Мангану між печінкою, зябрами та нирками, Купруму – між печінкою та зябрами порівняно з контролем. У щуки за концентрації іонів Fe^{3+} $0,2 \text{ мг/дм}^3$ спостерігалось зниження, а за $0,5 \text{ мг/дм}^3$ – підвищення вмісту Купруму у тканинах м'язів та нирок.
3. Динаміка змін вмісту РНК і ДНК у відповідь на підвищення концентрації Феруму відзначалась протилежним характером у коропа та щуки. Зміни співвідношення РНК/ДНК та чисел метаболічної активності за дії іонів Fe^{3+} свідчать про посилення експресії геному та біосинтезу білків, що підтверджується зростанням загальної кількості цих біополімерів у досліджених тканинах риб.
4. Активність аланінамінотрансферази за дії $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} зростала як в печінці, так і в сироватці крові коропа. Активність аспартатамінотрансферази зростала в печінці та знижувалася в сироватці крові коропа пропорційно до концентрації іонів Fe^{3+} у воді. За дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу у сироватці крові риб відмічене

зростання аланін- та аспартатамінотрансферази. Зміни активностей зазначених ферментів в печінці та сироватці крові риб спрямовані на перебудову амінокислотного та білкового метаболізму в їх організмі для забезпечення енергетичної та пластичної адаптації до стрес-дії токсиканта.

5. У зябрах обох видів риб за дії іонів Fe^{3+} знижувався вміст холестеролу та показник відношення холестерол/фосфоліпіди. Зміни вмісту жирних кислот, моно-, ди- та триацилгліцеролів у клітинах зябер мали різну направленість та залежали від концентрації іонів металу у воді та виду риб. У печінці коропа та щуки вплив іонів Fe^{3+} призводив до порушення синтезу холестеролу і фосфоліпідів та посилення ліполітичних процесів. Відмічено активне використання ліпідів м'язів риб для енергетичного забезпечення підтримання оптимальної кількості Феруму в організмі коропа за дії іонів Fe^{3+} .
6. Вплив підвищених концентрацій іонів Fe^{3+} викликав активацію ліполізу у тканинах печінки та зябер досліджуваних видів риб, про що свідчить зростання вмісту лізофосфатидилхоліну та зменшення – фосфатидилхоліну, фосфатидилсерину і фосфатидилінозитулу. Такі зміни, насамперед, спрямовані на підтримання енергетичного статусу організму риб для протидії токсичному чиннику.
7. Відмічено зростання кількості гемоглобіну, білка плазми крові коропа, активності лактатдегідрогенази та зниження вмісту гемоглобіну у щуки за впливу $0,5 \text{ мг/дм}^3$ іонів Fe^{3+} . Підвищений вміст іонів Fe^{3+} у воді призводив до зростання кількості металу в плазмі крові обох видів риб та збільшення показника насичення трансферину Ферумом (особливо у щуки).
8. У зябрах риб за дії $0,2 \text{ мг/дм}^3$ іонів Феруму антиоксидантна система ефективно інактивувала вільні радикали, про що свідчить зростання активності досліджуваних ферментів (СОД і каталази) та зниження продуктів ПОЛ (у 1,5 разів вмісту МДА, у 1,7 разів кількості ДК в

зябрах щуки та в 2,2 рази – гідропероксидів ліпідів у зябрах коропа). Високі концентрації іонів Fe^{3+} ($0,5 \text{ мг/дм}^3$) посилювали процеси пероксидного окиснення ліпідів в зябрах та печінці риб, на що вказує підвищення в 1,2 та 1,6 рази вмісту дієнових кон'югатів у печінці коропа і щуки та в 1,6 рази кількості гідропероксидів ліпідів у печінці коропа.

9. Одержані у дисертаційній роботі результати щодо змін вмісту гемоглобіну крові, Феруму та білка в плазмі крові, насичення трансферину Ферумом та активності лактатдегідрогенази в плазмі крові, кількості продуктів пероксидації і активності ферментів пероксидації в зябрах та печінці риб можуть бути використані як біомаркери інтоксикації організму риб іонами Fe^{3+} та для біоіндикації забруднення прісноводних водойм сполуками Феруму.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. А. с. № 1084681 СССР, МКИ G № 33/48. Способ определения гидроперекисей липидов в биологических тканях / Мирончик В.В. (СССР). № 3468369/28-13; заявл. 08.07.82; опубл. 07.04.84, Бюл. № 13.
2. Абрамова Ж.И., Оксенгендлер Г.И. Человек и противоокислительные вещества. Л. : Наука, 1985. 230 с.
3. Активність трансаміназ в організмі прісноводних риб за дії йонів заліза / Рабченко О.О., Бияк В.Я., Хоменчук В.О., Курант В.З. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія*. 2016. № 1 (65). С. 130–134.
4. Алемасова А.С., Луговой К.С. Экологическая аналитическая химия. Учебное пособие. Донецк : ДонНУ, 2010. 271 с.
5. Бейли Д. Методы химии белков. М. : Мир, 1965. 266 с.
6. Белозерский А.Н. Биохимия нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов. М. : Наука, 1976. 372 с.
7. Бердышев Г.Д., Проценко Н.А. Содержание нуклеиновых кислот у высших организмов. К. : Вища школа, 1978. 160 с.
8. Беспмятнов Г.П., Кротов Ю.А. Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. Справочник. Л. : Химия, 1985. 304 с.
9. Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества объектов окружающей среды : учебно-методическое пособие / А.Г. Бубнов [и др.]; под общ. ред. В.И. Гриневича; ГОУ ВПО Иван. гос. хим.-технол. ун-т. Иваново, 2007. 112 с.
10. Брагинский Л.П. Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia Magna* Str. и других ветвистоусых ракообразных (критический отбор). *Гидробиологический журнал*. 2000. № 5. С. 50–57.
11. Будников Г.К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем. *Соросовский образовательный журнал*. 1998. № 5. С. 23–20.

12. Ваганов А.С. Сравнительная характеристика содержания тяжелых металлов у промысловых видов рыб Куйбышевского водохранилища. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2011. Т. 13, № 5 (2). С. 143–146.
13. Владимиров Ю.А. Нарушение барьерных свойств внутренней и наружной мембран митохондрий, некроз и апоптоз. *Биологические мембраны*. 2002. № 19. С. 356–377.
14. Влияние физико-химических факторов на содержание тяжелых металлов в водных экосистемах / О.А. Давыдова, Е.С. Климов, Е.С. Ваганова, А.С. Ваганов; под науч. ред. Е.С. Климова. Ульяновск : УлГТУ, 2014. 167 с.
15. Возрастная и тканевая специфика чувствительности про- и антиоксидантной систем карповых рыб к действию тяжелых металлов / Рабаданова А.И., Габибов М.М., Чалаева С.А., Амирова Г.Р., Аюбова А.Ю. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2017. Т. 19, № 2 (2). С. 326–329.
16. Галкин В.В., Бердышев Г.Д. К вопросу о количественном определении нуклеиновых кислот биохимическими методами в тканях различных животных. *Биохимия*. 1968. Т. 33, № 1. С.66–76.
17. Грубінко В.В. Адаптивні реакції риб до дії аміаку водного середовища : автореф. дис... докт. біол. наук : 03.00.18 / 03.00.04 / В.В. Грубінко. К., 1995. 44 с.
18. Грубінко В.В., Арсан О.М. Динаміка амінокислот і амідів у прісноводних риб при дії амонію. *Доповіді НАН України*. 1991. Сер. Б, № 3. С. 142–145.
19. Демина Л.Л. Формы миграции тяжелых металлов в океане. М. : Наука, 1982. С. 31–43.
20. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М. : Мир, 1982. Т. 1. 390 с.

21. ДСТУ ISO 11885:2005 Якість води. Визначення 33 елементів методом атомно-емісійної спектрометрії з індуктивно-зв'язаною плазмою. Київ : Держспоживстандарт України, 2007. 13 с.
22. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.Я., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр СОД эритроцитов. *Лаб. дело*. 1983. № 10. С. 30–33.
23. Дэвидсон Дж. Биохимия нуклеиновых кислот. М. : Мир, 1976. 412 с.
24. Евтушенко Н.Ю., Дудник С.В. Механизмы поступления, распределения и выведения металлов из организма рыб. *Гидробиол. журн.* 2014. Т. 50, № 4. С. 63–77.
25. Житенева Л.Д. Экологические закономерности ихтиогематологии. Ростов-на-Дону : АзНИИРХ, 2000. 56 с.
26. Житенёва Л.Д., Рудницкая О.А., Калюжная Т.И. Эколого-гематологические характеристики некоторых видов рыб. Справочник. – Ростов на Дону : АзНИИРХ, 1997. 149 с.
27. Калачнюк Г.І., Гжицький С.З. Визначення концентрації білка у вмісті рубця за принципом виявлення пептидних зв'язків. ДАН УРСР. 1974. Сер. Б, № 4. С. 353–355.
28. Калачнюк Г.І., Грабовенський І.Й., Савка О.Г. Про оцінку метаболічної активності вмісту рубця. *Вісник с/г науки*. 1978. № 5. С.72–77.
29. Карпюк М.И., Зубченко И.А., Сокольский А.Ф. Теория биосорбции водных животных (научные основы и практическое использование). Астрахань, 2002. 333 с.
30. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М. : Мир., 1975. 322 с.
31. Кирпичников В.С. Генетика и селекция рыб. Л. : Наука, 1987. 519 с.
32. Климов А.Н. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. С. Пб. : Питер, 1999. Часть 1. С. 55–56.

33. КНД (керівний нормативний документ) 211.1.4.032-95 Методика визначення міді атомно-абсорбційним методом в поверхневих та стічних водах. Київ : Мінекобезпеки України, 1995. 10 с.
34. Кондрашова М.Н. Взаимодействие процессов переаминирования и окисления карбоновых кислот при различных функциональных состояниях ткани. Биохимия. 1991. Т. 56, Вып. 3. С. 388–405.
35. Коновалов Ю.Д. Аланин- и аспартатаминотрансферазная активность в яйцеклетках, овариальной и перивителлиновой жидкостях белого амура. *Укр. биохим. журн.* 1979. Т. 51, № 6. С. 592–595.
36. Коновалов Ю.Д. Свойства, локализация, роль и возможные пути регуляции активности протеиназ и аминотрансфераз в раннем онтогенезе рыб. *Усп. совр. биол.* 1986. Т. 101, Вып. 3. С. 359–373.
37. Коробейников Э.Н. Модификация определения продуктов ПОЛ в реакции с тиобарбитуровой кислотой. *Лаб. дело.* 1989. № 7. С. 8–10.
38. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело.* 1988. № 1. С. 16–18.
39. Курант В.З. Роль білкового обміну в адаптації риб до дії іонів важких металів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. біол. наук : спец. 03.00.10 «Іхтіологія» / В.З. Курант. К., 2003. 38 с.
40. Кусень С.Й., Пашковська И.С. Вплив амінокислот, гормонів і актиноміцину Д на активність аминотрансфераз у незаплідненій ікрі в'юна (*Misgurnus fossilis*). *Укр. біохім. журн.* 1973. Т. 45, № 5. С. 565–570.
41. Кушаковський М.С. Клинические формы повреждения гемоглобина. Л. : Медицина, 1968. 324 с.
42. Лав М.Р. Химическая биология рыб. М. : Пищевая промышленность, 1976. 349 с.
43. Лакин Г.Ф. Биометрия : Учебное пособие для биол. спец. вузов. 4-е. изд., перераб. и доп. / Г.Ф. Лакин. М. : Высш. шк., 1990. 352 с.

44. Ленинджер А. Основы биохимии : В 3-х т. Пер. с англ. / А. Ленинджер. М. : Мир, 1985. Т 1. 365 с.
45. Линник П.Н., Набиванец Б.И. Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах. Л. : Гидрометеиздат, 1986. 241 с.
46. Лукьяненко В.И. Общая ихтиотоксикология. М. : Легкая и пищевая пром-сть, 1983. 320 с.
47. Моисеенко Т.И. Водная экотоксикология : Теоретические и прикладные аспекты. М. : Наука, 2009. 400 с.
48. Мур Дж., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах. – М. : Мир, 1987. 265 с.
49. Мусаев Б.С., Мурадова Г.Р., Рабаданова А.И. Влияние хронической интоксикации ацетатом свинца на фракционный состав белков и некоторые показатели лиридного обмена скелетных мышц сеголеток карпа (*Cyprinus carpio* L.). *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2009. Т. 11, № 1 (2). С. 110–113.
50. Накопичення феруму в організмі прісноводних риб за його підвищеного вмісту у водному середовищі / Рабченко О.О., Хоменчук В.О., Ляврін Б.З., Курант В.З. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія*. 2017. № 1 (68). С. 96–101.
51. Немова Н.Н. Механизмы биохимической адаптации у водных организмов : экологические и эволюционные аспекты. *Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Экологическая физиология и биохимия водных организмов* : Сборник научных статей. Петрозаводск : КарНЦ РАН. 2010. Т. 1. С. 198–214.
52. Никаноров А.М., Жулидов А.В. Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах. Л. : Гидрометеиздат, 1991. 312 с.
53. Обобщенный перечень предельно-допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно-безопасных уровней воздействия вредных веществ (ОБУВ) для воды рыбохозяйственных водоемов / Минрыбхоз СССР. М., 1990. 44 с.

54. Особа І.А. Вміст продуктів вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів у скелетних м'язах та печінці однорічок лускатих та рамчастих коропів несвицького зонального типу. *Біологія тварин*. 2012. Т. 14, № 1–2. С. 179–183.
55. Папина Т.С. Отбор проб, как важная составляющая экоаналитического контроля речных экосистем. *Экологическая химия*. 2004. № 4. С. 229–235.
56. Папина Т.С. Транспорт и особенности распределения тяжелых металлов в речных экосистемах. Новосибирск : СО РАН, 2001. 58 с.
57. Пасхина Т.С. Инструкция по определению глутамикоаспарагиновой и глутамикоаланиновой трансаминаз (аминотрансфераз) в сыворотке крови человека. М. : Здоровье, 1974. 22 с.
58. Проблемы экоаналитического контроля крупных рек (на примере р. Обь) / Эйрих А.Н., Эйрих С.С., Папина Т.С. и др. *Ползуновский вестник*, 2008. № 1–2. С. 157–160.
59. Прохорова М.И. Методы биохимического исследования. Л. : Изд. ЛГУ., 1982. 222 с.
60. Пудовкин Н.А. Свободнорадикальные процессы в организме разных видов животных и пути их коррекции железом – и селенсодержащими препаратами : дис. ... док. биол. наук : 03.03.01; 06.02.03 / Н.А. Пудовкин; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана». Казань, 2015. 291 с.
61. Рабченко О.О., Хоменчук В.О., Курант В.З. Ферум у водних екосистемах : форми знаходження, біологічне значення та токсичність для риб. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія*. 2016. № 3–4 (67). С. 107–119.
62. Романенко В.Д. Печень и регуляция межклеточного обмена (млекопитающие и рыбы). К. : Наукова думка. 1978. 183 с.

63. Романенко В.Д., Малышева Т.Д., Євтушенко Н.Ю. Роль отдельных органов в механизмах регуляции обмена цинка у рыб. *Гидробиол. журн.* 1985. Т. 21, № 3. С. 57–62.
64. Сенник Ю.І. Зміни ліпідного складу тканин прісноводних риб за дії цинку та кадмію : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.04 «Біохімія» / Ю.І. Сенник. Львів, 2015. 20 с.
65. Серпунин Г.Г. Ихтиогематологические исследования как элемент биологического мониторинга водоемов. *Наземные и водные экосистемы Северной Европы : управление и охрана*. Мат-лы междунар. конф., посвящ. 50-летию ин-та Карел. науч. центра РАН. 8–11 сентября 2003, Петрозаводск. Петрозаводск : Ин-т биол. КарелНЦ РАН, 2003. С. 130–131.
66. Серсенов А.С. О количественном определении белка в пробе ткани, использованной для экстрагирования нуклеиновых кислот. *Тр. ин-та экспер. биол. АН Каз.ССР*. 1977. Вып.12. С. 127–129.
67. Сидоров В.С. Аминокислоты рыб. *Биохимия молоди пресноводных рыб*. Петрозаводск, 1985. С. 103–137.
68. Смирнов Л.П., Богдан В.В. Липиды в физиолого-биохимических адаптациях экотермных организмов к абиотическим и биотическим чинникам среды. М. : Наука, 2007. 187 с.
69. Стальная И.Д. Определение диеновых конъюгатов : Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. М : Медицина, 1977. С. 63–64.
70. Стефаник М.Б., Скорохид В.И., Елисеева О.П. Тонкослойная и газожидкостная хроматография липидов. Л. : Мир., 1985. 27 с.
71. Сущик Н.Н. Роль незаменимых жирных кислот в трофометаболических взаимодействиях в пресноводных экосистемах (обзор). *Журнал общей биологии*. 2008. Т. 69, № 4. С. 299–316.
72. Уильямс Д. Металлы жизни. М. : Мир, 1975. 236 с.

73. Физиолого-биохимические и генетические исследования ихтиофауны Азово-Черноморского бассейна / Методическое руководство. Ростов-на-Дону : Эверест, 2005. 105 с.
74. Фосфоліпідний склад окремих тканин коропа та щуки за дії іонів Fe^{3+} / Рабченко О.О., Хоменчук В.О., Курант В.З., Грубінко В.В. *Доповіді Національної академії наук України*. 2017. № 1. С. 97–102.
75. Хлебович В.В. Акклимация животных организмов. Л. : Наука, 1981. 135 с.
76. Хоменчук В.О. Біохімічні особливості проникнення і розподілу деяких важких металів в організмі коропа лускатого : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.04 «Біохімія» / В.О. Хоменчук. Львів, 2003. 18 с.
77. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М. : Мир, 1988. 568 с.
78. Цанев Р.Г., Марков Г.Г. К вопросу о количественном спектрофотометрическом определении нуклеиновых кислот. *Биохимия*. 1960. Т. 25, № 1. С. 151–159.
79. Шульман Г.Е., Аболмасова Т.И., Столбов А.Я. Использование белка в энергетическом обмене гидробионтов. *Успехи совр.биол.* 1993. Т. 113, № 5. С. 576–580.
80. Яковенко Б.В., Курант В.З., Явоненко А.Ф. Влияние температуры и pH среды на активность некоторых аминотрансфераз в тканях карпа. *Гидробиол. журн.* 1981. Т. 17, № 2. С. 69–72.
81. Янин Е.П. Техногенные геохимические ассоциации в донных отложениях малых рек. М. : Мир, 2002. 322 с.
82. Янович Н.Є., Кравців Р.Й. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів і активність антиоксидантних ферментів у тканинах коропа за різного вмісту марганцю у воді. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2008. Т. 10, № 4 (39). С. 296–299.

83. Янович Н.Є., Янович Д.О. Роль мікроелементів у життєдіяльності ставкових риб. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2014. Т. 16, № 2 (59). С. 345–342.
84. A new phospholipase C-4 is induced at S-phase of the cell cycle and appears in the nucleus / Liu N., Fukami K., Yu H. [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 355–360.
85. Abboud S., Haile D.J.J. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 19906–19912.
86. Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria / Chen W., Paradkar P.N., Li L., Pierce E.L. [et al.]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009. Vol. 106. P. 16263–16268.
87. Abe A., Kelly R., Shaymana J.A. The measurement of lysosomal phospholipase A₂ activity in plasma. *J. of Lipid Res.* 2010. Vol. 51. P. 2464–2470.
88. Adiele R.C., Stevens D., Kamunde C. Reciprocal enhancement of uptake and toxicity of cadmium and calcium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver mitochondria. *Aquatic Toxicology*. 2010. Vol. 96. P. 319–327.
89. Agius C., Roberts R.J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. Fish Dis.* 2003. Vol. 26. P. 499–509.
90. Aisen P., Enns C., Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *International Journal Biochemical Cell Biology*. 2001. Vol. 33. P. 940–959.
91. Allen T., Singhal R., Rana S.V. Resistance to oxidative stress in a freshwater fish *Channa punctatus* after exposure to inorganic arsenic. *Biological Trace Element Research*. 2004. Vol. 98. P. 63–72.
92. Alterations in physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to Copper and Copper/Zinc mixtures / Dethlo

- Gail M., Schlenk Daniel, Hamm Jonathan T., Bailey Howard C. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1999. Vol. 42. P. 253–264.
93. Andersen O. Accumulation of waterborne iron and expression of ferritin and transferrin in early developmental stages of brown trout (*Salmo trutta*). *Fish Physiol. Biochem.* 1997. Vol. 16. P. 223–231.
 94. Andrews N.C. ABCs of erythroid mitochondrial iron uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009. Vol. 106. P. 16012–16013.
 95. Are metal mining effluent regulations adequate: identification of a novel bleached fish syndrome in association with iron-ore mining effluents in Labrador, Newfoundland / Payne J.F., French B., Hamoutene D. [et al.]. *Aquat. Toxicol.* 2001. Vol. 52. P. 311–317.
 96. Arosio P., Levi S. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. Vol. 1800. P. 783–792.
 97. Assessing pollution in the Danube River near Novi Sad (Serbia) using several biomarkers in sterlet (*Acipenser ruthenus* L.). / Stanic B., Andric N., Zoric S. [et al.]. *Ecotox. Environ. Saf.* 2005. Vol. 65 (3). P. 395–402.
 98. Atanasiu V., Manolescu B., Stoian I. Heparin – central regulator of iron metabolism. *Eur. J. Haematol.* 2007. Vol. 78. P. 1–10.
 99. Atli G., Canli M. Natural occurrence of metallothionein-like proteins in the liver of fish *Oreochromis niloticus* and effects of cadmium, lead, copper, zinc, and iron exposures on their profiles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2003. P. 618–627.
 100. Avenant-Oldewage A., Marx H.M. Bioaccumulation of chromium, copper and iron in the organs and tissues of *Clarias gariepinus* in the Olifants River, Kruger National Park. *Water SA*. 2000. Vol. 26, № 4. P. 569–582.
 101. Balsinde J. Roles of various phospholipases A₂ in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling. *Biochem. J.* 2002. Vol. 364. P. 695–702.

102. Banaee M., Davoodi M.H., Zoheiri F. Histopathological changes induced by paraquat on some tissues of gourami fish (*Trichogaster trichopterus*). *Open Veterinary Journal*. 2013. P. 36–42.
103. Bergmeyer H.G., Bernet E. Methods of enzymatic analysis. Vienne : Verlag Chemie., 1974. P. 324–328.
104. Biliary excretion of iron from hepatocyte lysosomes in the rat. A major excretory pathway in experimental iron overload / LeSage G.D., Kost L.J., Barham S.S., LaRusso N.F. *J. Clin. Invest.* 1986. Vol. 77. P. 90–97.
105. Biochemical effects of long-term exposure to Cr, Cd, Ni on rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Rich.-influence of sex and season / Arillo A., Targiocco C., Melodia F., Mensi F. *Chemosphere*. 1982. Vol. 11. P. 47–57.
106. Biogeochemistry of iron oxidation in a circumneutral freshwater habitat / Duckworth O.W., Holmstrom S.J.M., Pena J., Sposito G. *Chem. Geol.* 2009. Vol. 260 a, № 3–4. P. 149–158.
107. Borbely G., Nagy E. Removal of zinc and nickel ions by complexation–membrane filtration process from industrial wastewater. *Desalination*, 2004. Vol. 240. P. 218–226.
108. Both Nramp1 and DMT1 are necessary for efficient macrophage iron recycling / Soe-Lin S., Apt S.S., Mikhael M.R. [et al.]. *Exp. Hematol.* 2010. Vol. 38. P. 609–617.
109. Bradley R.W., DuQuesnay C., Sprague J.B. Acclimation of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to zinc: Kinetics and mechanism of enhanced tolerance induction. *J. Fish Biol.* 1985. Vol. 27. P. 367–379.
110. Brewer G.J. Risks of copper and iron toxicity during aging in humans. *Chem. Res. Toxicol.* 2010. Vol. 23. P. 319–326.
111. Brown D.A., London E. Structure and function of sphingolipid and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 17221–17224.
112. Bury N., Grosell M. Waterborne iron acquisition by a freshwater teleost fish, zebrafish *Danio rerio*. *J. Exp. Biol.* 2003. Vol. 206 b. P. 3529–3535.

113. Canli M., Atli G. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environ. Pollut.* 2003. Vol. 121, № 1. P. 129–136.
114. Carriquiriborde P., Handy R.D., Davies S.J. Physiological modulation of iron metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low and high iron diets. *J. Exp. Biol.* 2004. Vol. 207. P. 75–86.
115. Chapman P.M., Wang F. Issues in ecological risk assessment of inorganic metals and metalloids. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 2000. Vol. 6. P. 965–988.
116. Chen W., Dailey H.A., Paw B.H. Ferrochelatase forms an oligomeric complex with mitoferrin-1 and Abcb10 for erythroid heme biosynthesis. *Blood.* 2010. Vol. 116. P. 628–630.
117. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes / Ohvo-Rekila H., Ramstedt B., Leppimäki P., Slotte J.P. *Prog. Lipid Res.* 2002. Vol. 41. P. 66–97.
118. Cooper C.A., Bury N.R. The gills as an important uptake route for the essential nutrient iron in freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Fish Biol.* 2007. Vol. 71. P. 115–128.
119. Cooper C.A., Handy R.D., Bury N.R. The effects of dietary iron concentration on gastrointestinal and branchial assimilation of both iron and cadmium in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 2006. Vol. 79 b. P. 167–175.
120. Davies K.J.A. Oxidative stress the paradox of life. *Biochemical Societies Symposia.* 2000. Vol. 61. P. 1–31.
121. De Smet H., Blust R., Moens L. Cadmium-binding to transferrin in the plasma of the common carp *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol Pharmacol.* 2001. Vol. 128. P. 45–53.
122. Detoxification and cellular stress responses of unionid mussels *Unio tumidus* from two cooling ponds to combined nano-ZnO and temperature

- stress / Falfushynska H., Gnatyshyna L., Ivanina A., Sokolova I., Stoliar O. *Chemosphere*. 2018. Vol. 193. P. 1127–1142.
123. Di Giulio R.T., Hinton D.E. Reactive oxygen species and oxidative stress. *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, Taylor and Francis Group. 2008. P. 273–324.
 124. Divalent metal-ion transporter DMT1 mediates both H^+ -coupled Fe^{2+} transport and uncoupled fluxes / Mackenzie B., Ujwal M.L., Chang M.H. [et al.]. *Pflugers Arch*. 2006. Vol. 451. P. 544–558.
 125. DNA oxidative damage and vitamin A reduction in fish from a large lake system in Labrador, Newfoundland, contaminated with iron-ore mine tailings / Payne J.F., Malins D.C., Gunselman S. [et al.]. *Mar. Environ. Res*. 1998. Vol. 46. P. 289–294.
 126. Doherty V.F., Ogunkuade O.O., Kanife U.C. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in some selected fishes in Lagos, Nigeria. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*. 2010. Vol. 7 (3). P. 359–365.
 127. Dowhan W., Bogdanov M. Functional roles of lipids in membranes. *New Comprehensive Biochem*. 2002. Vol. 36. P. 1–35.
 128. Drevnickand P.E., Sandheinrich M.B. Effects of dietary methyl mercury on reproductive endocrinology of Fathead minnows. *Environ. Sci. Technol*. 2003. Vol. 37. P. 4390–4396.
 129. Duckworth O.W., Bargar J.R., Spositio G. Coupled biogeochemical cycling of iron and manganese as mediated by microbial siderophores. *Biometals*. 2009. Volume 22 b. P. 605–613.
 130. Edison E.S., Bajel A., Chandy M. Iron homeostasis : new players, newer insights. *European Journal of Haematology*. 2008. Vol. 81. P. 411–424.
 131. Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata* / Ghada S., Nouha S., Fatma Y., Khira M. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2013. Vol. 89. P. 1–7.

132. Effects of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias latipes*) : Antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology / Li H.C., Zhou Q., Wu Y. [et al.]. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 2009. Vol. 72 (3). P. 684–692.
133. Eichenberger E. The interrelation between essentiality and toxicity of metals in the aquatic ecosystem. *Metalions in biological systems : N.Y. and Basel*. 1992. Vol. 20, № 3. P. 67–100.
134. Elimination of adhesiveness in the eggs of shishamo smelt *Spirinchus lanceolatus* using kaolin treatment to achieve high hatching rate in an environment with a high iron concentration / Mizuno S., Sasaki Y., Omoto N., Imada K. *Aquaculture*. 2004. Vol. 242. P. 713–726.
135. Emerit J., Beamont C., Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomedical Pharmacology*. 2001. Vol. 55. P. 333–339.
136. Endocrine activities and cellular stress responses in the marsh frog *Pelophylax ridibundus* exposed to cobalt, zinc and their organic nanocomplexes / Falfushynska H., Gnatyshyna L., Fedoruk O., Sokolova I., Stoliar O. *Aquatic Toxicology*. 2016. Vol. 170. P. 62–71.
137. Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins / Thomas J.P., Geiger P.G., Maiorino M. [et al.]. *Biochim. et Bioph. Acta*. 1990. Vol. 1045. P. 252–260.
138. Ercal N., Gurer-Orhan H., Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I : Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2001. Vol. 1. P. 529–539.
139. Ersoy B., Celik M. The essential and toxic elements in tissues of six commercial demersal fish from Eastern Mediterranean Sea. *Food Chem. Toxicol.* 2010. Vol. 48. P. 1377–1382.
140. Experimental study of trace metal chemistry in Soft-Water Lakes at different pH levels / Jackson Togwell A., Kipphut George, Hesslein Raymond H., Schindler David W. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1980. Vol. 37, № 3. P. 387–402.

141. Eyrikh S.S., Papina T.S. Representative sampling method as a key stage of quality assurance of analytical data for the annual contaminant loads calculations. *Proc. of 6-th International Conference on mercury as a global pollutant*. Minamata, Japan, 2001. P. 7915–7919.
142. Finean J. Michele P. Membrane-bound enzymes. Membrane structures. North. : *Holland Biomed. Press*, 1991. P. 161–214.
143. Firat O., Kargin F. Individual and combined effects of heavy metals on serum biochemistry of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2010. Vol. 58 (1). P. 151–157.
144. Fish cancer developed by environmental pollutants / Madhuri S., Pandey Govind, Bhandari Rita, Shrivastav A.B. *International Research Journal of Pharmacy*. 2012. Vol. 3 (10). P. 17–19.
145. Fish immunotoxicology : research at the crossroads of immunology, ecology and toxicology / Segner Helmut, Möller Anja Maria, Wenger Michael, Casanova-Nakayama Ayako. *Advanced Environmental Studies by Young Scientists. Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry*. Tokyo: Terra Scientific Publishing Company. 2012. Vol. 6. P. 1–12.
146. Fosslien A. Mitochondrial medicine-molecular pathology of defective oxidative phosphorylation. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2001. Vol. 31. P. 25–67.
147. Fox L.E., Wofsy S.C. Kinetics of removal of iron colloids from estuarine waters. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1983. Vol. 47. P. 211–216.
148. Fukushima M., Tatsumi K. Light acceleration of iron (III) reduction by humic acid in the aqueous solution. *Colloids Surf.* 1999. Vol. 155. P. 249–258.
149. Functional the red lipidbilayers / Knoll W., Frank C.W., Heibel C. [et al.]. *J. Biotechnol.* 2000. Vol. 74. P. 137–158.
150. Ganz T., Nemeth E. Iron imports. Heparidin and regulation of body iron metabolism. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 2006. Vol. 290. P. 199–203.

151. Gastrointestinal uptake and distribution of copper in rainbow trout / Clearwater S.J., Baskin S.J., Wood C.M., McDonald D.G. *J. Exp. Biol.* 2000. Vol. 203. P. 2455–2466.
152. Genomic characterization and gene expression analysis of four hepcidin genes in the redbanded seabream (*Pagrus auriga*) / Martin-Antonio B., Jimenez-Cantizano R.M., Salas-Leiton E. [et al.]. *Fish Shellfish Immunol.* 2009. Vol. 26. P. 483–491.
153. Gregorovic' G., Kralj-Klobuc'ar N., Kopiar N. Histological and morphometric study on the tissue and cellular distribution of iron in carp *Cyprinus carpio* L. During chronic waterborne exposure. *J. Fish Biol.* 2008. Vol. 72. P. 1841–1846.
154. Gulik-Krzywicki T. Structural studies of the associations between biological membrane components. *Comp. Biochem. Physiol.* 1995. Vol. 105, № 1. P. 161–214.
155. Gurzau Eugen S., Neagu Corneliu, Gurzau Anca Elena. Essential metals—case study on iron. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2003. Vol. 56. P. 190–200.
156. Hamer D.H. Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* 1986. Vol. 55. P. 913–951.
157. Heavy metals of relevance to human health induce genomic instability / Coen N., Mothersill C., Kadhim M., Wright E.G. *Pathol.* 2001. P. 293–299.
158. Hem I.D. Study and interpretation of the chemical characteristics of natural water (3rd edn.) United States Geological Survey Water Supply. United States Government Printing Office, Washington DC, USA. 1989. 2254 p.
159. Hemmadi V. A critical review on integrating multiple fish biomarkers as indicator of heavy metals contamination in aquatic ecosystem. *International Journal of Bioassays.* 2017. Vol. 6 (9). P. 5494–5506.

160. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization / Nemeth E., Tuttle M.S., Powelson J. [et al.]. *Science*. 2004. Vol. 306. P. 2090–2093.
161. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse / Vulpe C.D., Kuo Y.M., Murphy T.L., Cowley L. [et al.]. *Nat. Genet.* 1999. Vol. 21. P. 195–199.
162. Hokin L.E., Hexum T.D. Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase IX. On the role of phospholipids in the enzyme. *Arch. Biochem. and Biophys.* 2002. Vol. 151, № 2. P. 58–61.
163. Identification of an intestinal heme transporter / Shayeghi M., Latunde-Dada G.O., Oakhill J.S., Laftah A.H. [et al.]. *Cell*, 2005. Vol. 122. P. 789–801.
164. Ikpesu T.O., Osioma E. Excess iron load: Physiological responses and oxidative stress. *International journal of Chemical, Gas and Material Science*. 2017. Vol. 1. P. 14–22.
165. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium / Lionetto M.G., Giordano M.E., Vilella S., Schettino T. *Aquat. Toxicol.* 2000. Vol. 48, № 4 P. 561–571.
166. Inhibition of proton pumping in membrane reconstituted bovine heart cytochrome c oxidase by zinc binding at the inner matrix side / Martino P.L., Capitanio G., Capitanio N., Papa S. *Biochim. et Bioph. Acta*. 2011. Vol. 1807. P. 1075–1082.
167. IPCS Environmental Health Criteria 200 Copper // World Health Organization, International Programme on Chemical Safety. Geneva, 1998.
168. Iron handling and gene expression of the divalent metal transporter, DMT1, in the kidney of the anemic Belgrade (b) rat / Ferguson C.J., Wareing M., Delannoy M. [et al.]. *Kidney Int.* 2003. Vol. 64. P. 1755–1764.

169. Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages / Knutson M.D., Vafa M.R., Haile D.J., Wessling-Resnick M. *Blood*. 2003. Vol. 102. P. 4191–4197.
170. ISO (1986) Water quality – Determination of cobalt, nickel, copper, zinc, cadmium and lead – Flame atomic absorption spectrometric methods. Geneva, International Organization for Standardization (ISO 8288–1986 (E)). – Режим доступа : www.iso.org/iso/iso_catalogue.
171. Jezierska B., Witeska M. Summary of metal-induced disturbances in fish organism. In : *Metal Toxicity to Fish*. Wydawnictwo Akademii Podlaskiej, Siedlce. 2001. P. 214–243.
172. Karanjkar D.M., Deshpande V.Y. Iron induced changes in biochemical composition of freshwater fish *Gonoproktopterus kolus* (Sykes). *IRA-International Journal of Applied Sciences*. 2016. Vol. 4 (3). P. 407–419.
173. Khan A.A., Quigley J.G. Heme and FLVCR-related transporter families SLC48 and SLC49. *Mol. Aspects. Med.* 2013. Vol. 34 (2–3). P. 669–682.
174. Kharbanda K.K. Role of transmethylation reactions in alcoholic liver disease. *World J. Gastroenterol.* 2007. Vol. 13, № 37. P. 4947–4954.
175. Killian J.A. The "double life" of membrane lipids. *EMBO Reports*. 2001. Vol. 21. P. 91–95.
176. Kodaki T., Yamashita S. Phosphatidylethanolamine methylation pathway. *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. P. 15428–15435.
177. Kovacik A. Oxidative stress in fish induced by environmental pollutants. *Scientific Papers : Animal Science and Biotechnologies*. 2017. Vol. 50 (1). P. 121–125.
178. Kwong R.W., Niyogi S. Anin vitro examination of intestinal iron absorption in a freshwater teleost, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Comp. Physiol.* 2008. Vol. 178 B. P. 963–975.
179. Laboratory measurements and modeling of metal–humic interactions under estuarine conditions / Hamilton-Taylor J., Posthill A.S., Tipping E., Harper P.M. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 2002. Vol. 66. P. 403–415.

180. Lappivaara J., Kiviniemi A., Oikari A. Bioaccumulation and subchronic physiological effects of waterborne iron overload on whitefish exposed in humic and nonhumic water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1999. Vol. 37. P. 196–204.
181. Lau O.W., Cheng O.M. Determination of Zinc in environmental samples by anodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, 1998. Vol. 376. P. 197–207.
182. Leslie J.M., Buckley J.T. Phospholipid composition of gold fish (*Carassius auratus* L.) liver and brain and temperature-dependence of phosphatidylcholine synthesis. *Comp. Biochem. Physiol.* 2006. Vol. 53 B, № 3. P. 335–337.
183. Lewis A.H., McElhaney R.N. Surface charge markedly attenuates the nonlamellar phase-forming properties of lipid bilayer membranes : calorimetric and ³¹P-nuclear magnetic resonance studies of mixtures of cationic, anionic, and zwitterionic lipids. *Biophys. J.* 2000. Vol. 79, № 3. P. 1455–1464.
184. Light-induced redox cycling of iron in circumneutral lakes / Emmenegger L., Schonenberger R.R., Sigg L., Sulzberger B. *Limnol. Oceanogr.* 2001. № 46. P. 49–61.
185. Lindahl M., Tagesson Ch. Zinc (Zn²⁺) binds to and stimulates the activity of group I but not group II phospholipase A₂. *Inflammation*. 1996. Vol. 20. P. 599–611.
186. Lipids, trophic relationships, and biodiversity in Arctic and Antarctic krill / Falk-Petersen S., Hagen W., Kattner G. [et al.]. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2000. № 57. P. 178–191.
187. Livingstone D.R. Oxidative stress in aquatic organism in relation to pollution and agriculture. *Revue de Medical Veterinary*. 2003. Vol. 154. P. 427–430.
188. Lofts S., Tipping E., Hamilton-Taylor J. The chemical speciation of Fe (III) in freshwaters. *Aquat. Geochem.* 2008. Vol. 14, № 4. P. 337–358.

189. Long S.E., Martin T.D., Smoly C.K. (Ed.). Determination of trace elements in waters and wastes by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Methods for Determination of Metals in Environmental Samples, Environmental Monitoring System Laboratory, Methods* 200.8. USEPA, Chelsea, MI. 1992.
190. Lushchak V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. 2011. Vol. 1. P. 13–30.
191. Maeshima Y., Makino H. Molecular mechanism of cell injury. *Contrib. Nephrol.* 2003. Vol. 139. P. 32–43.
192. Mahadevappa V.G., Holub B.J. The molecular species composition of individual diacylphospholipids in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta*. 2002. Vol. 713. P. 73–79.
193. Mahboob S. Environmental pollution of heavy metals as a cause of oxidative stress in fish : a review. *Life Sci. J.* 2013. Vol. 10. P. 336–347.
194. McMullen T.P.W., Lewis R.N.A.H., McElhaney R.N. Cholesterol–phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 2004. Vol. 8. P. 459–468.
195. Merrill A.H., Sweely C.C. Sphingolipid : metabolism and cell signaling. *In Biochem. of lipids, lipoproteins and membranes*. 1996. Vol. 31. P. 309–339.
196. Metallothionein as a biomarker to assess the effects of pollution on indian major carp species from Wastewater-Fed Fishponds of East Calcutta Wetlands (a Ramsar Site) / Utpal S.R., Chattopadhyay B., Datta S., Mukhopadhyay S.K. *Environmental Research, Engineering and Management*. 2011. P. 10–17.
197. Metallothioneins, caspase-3 and oxidative stress responses in the multi-marker study of freshwater mussel inhabiting sites of various human impact / Falfushynska H.I., Gnatyshyna L.L., Gyori J., Stoliar O.B. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences (TrJFAS)*. 2014. Vol. 14. P. 591–603.

198. Metals as a cause of oxidative stress in fish : a review / Sevcikova M., Modra H., Slaninova A., Svobodova Z. *Veterinari Medicina*. 2011. Vol. 56 (11). P. 537–546.
199. Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation / Shaw G.C., Cope J.J., Li L., Corson K. [et al.]. *Nature*. 2006. Vol. 440. P. 96–100.
200. Molecular and functional roles of duodenal cytochrome b (Dcytb) in iron metabolism / Latunde-Dada G.O., Westhuizen J.V.D., Vulpe C.D. [et al.]. *Blood Cell Mol*. 2002. Vol. 29. P. 356–360.
201. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants / Valavanidis Athanasios, Vlahogianni Thomais, Dassenakis Manos, Scoullou Michael. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2006. Vol. 64. P. 178–189.
202. Mukhopadhyay M.K., Konar S.K. Effects of copper, zinc and iron mixture on fish and aquatic ecosystem. *Environ. Ecol*. 1985. Vol. 3, № 1. P. 58–64.
203. Muriel Dunier. Water pollution and immunosuppression of freshwater fish. *Italian Journal of Zoology*. 1996. Vol. 63 (4). P. 303–309.
204. Nemeth E., Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol*. 2009. Vol. 122. P. 78–86.
205. Nickel induced histopathological changes in the different tissues of freshwater fish, *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes) / Athikesavan S., Vincent S., Ambrose A., Velmurugan B. *Journal of Environmental Biology*. 2006. P. 391–395.
206. Nishida Y. The chemical process of oxidative stress by copper (II) and iron (III) ions in several neurodegenerative disorders. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*. 2011. Vol. 142. P. 375–384.
207. Nuclear calcium signaling / Bootman M.D., Thomas D., Tovey S.C. [et al.]. *Cell. Mol. Life Sci*. 2000. Vol. 57. P. 371–388.

208. Ordering effects of cholesterol and its analogues / Rog T., Pasenkiewicz-Gierula M., Vattulainen I., Karttunen M. *Biochim. et Biophys. Acta*. 2009. Vol. 1788. P. 97–121.
209. Otitoloju A.A., Don-Pedro K.N. Bioaccumulation of heavy metals (Zn, Pb, Cu and Cd) by *Tympanotonus fuscatus var radula* (L.) exposed to sublethal concentrations of the test metal compounds in laboratory bioassays. *WAJAE*. 2002. Vol. 3a. P. 17–29.
210. Oxidation kinetics of Fe (II) in a eutrophic Swiss lake / Emmenegger L., King D.W., Sigg L., Sulzberger B. *Environ. Sci. Technol.* 1998. № 32. P. 2990–2996.
211. Oxidative stress and DNA damage in relation to transition metals overload in Abu-Qir Bay, Egypt / Haïam M., Aboul E., Abi A. [et al.]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2011. Vol. 9. P. 51–58.
212. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metalcontaminated river / Ruas C.B.G., Carvalho C.D., Araujo H.S.S. [et al.]. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 2008. Vol. 71. P. 86–93.
213. Panfoli I., Burlando B., Viarengo A. Effects of heavy metals on phospholipase C in gill and digestive gland of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comparative Biochem. and Physiol.* 2000. Vol. 127, Part B. P. 391–397.
214. Pazhanisamy K., Kennadi P., Rengarajan R. Effect of copper in the lipid content of freshwater fish *Tilapia mossambicus*. *International Journal of Current Research*. 2016. Vol. 8. Issue 09. P. 39304–39307.
215. Pedrajas J.R., Peinado J., López-Barea J. Purification of Cu, Zn superoxide dismutase isoenzymes from fish liver : appearance of new isoforms as a consequence of pollution. *Free Rad. Res. Commun.* 1993. Vol. 19. P. 29–41.

216. Photochemical cycling of iron in the surface ocean mediated by microbial iron (III)-binding ligands / Barbeau K., Rus E.L., Bruland K.W., Butler A. *Nature*. 2001. № 413. P. 409–413.
217. Piano A., Valbonesi P., Fabbri E. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress Chaperon*. 2004. Vol. 19 (2). P. 134–142.
218. Playle R.C., Dixon D.G., Burnison K. Copper and cadmium binding to fish gills : modification by dissolved organic carbon and synthetic ligands. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2011. P. 2667–2677.
219. Poss K.D., Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997. Vol. 94. P. 10919–10924.
220. Powell J.J., Jugdaohsingh R., Thompson R.P.H. The regulation of mineral absorption in the gastrointestinal tract. *Proc. Nutr. Soc.* 1999. Vol. 58 a. 147–153.
221. Profit of metallbinding proteins and heme oxygenase in red carp treated with heavy metals, pesticides and surfactants / Aricshi T., Shiba S., Hasegawa H., Arizona K. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.* 1990. Vol. 44, № 4. P. 643–649.
222. Protasowicki M., Chodynecki A. Bioacumulacja Cd, Pb, Cu, Zn w karpie – *Cyprinus carpio* L. w zaleznosci od stezeja w wodie i czasu ekspozycji. *Lesz. nauk. ryb. mor. i technol. zywn.* Szczecin, 1988. Vol. 17. P. 69–84.
223. Protein measurement with the Folin phenol reagent / Lowry J.O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. [et al.]. *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.
224. Pruell R.J., Engelhardt F.R. Liver cadmium uptake, catalase inhibition and cadmium thionein production in the killifish (*Fundulus heteroclitus*)

- induced by experimental cadmium exposure. *Mar. Environ. Res.* 1980. Vol. 3. P. 101–111.
225. Rayment G.E., Barry G.A. Indicator tissues for heavy metal monitoring – additional attributes. *Marine Pollution Bulletin*. 2000. Vol. 41, № 7–12. P. 353–358.
 226. Reynolds L.J., Hughes L.L., Louis A.I. Metal ion and salt effects on the phospholipase A₂, lysophospholipase, and transacylase activities of human cytosolic phospholipase A₂. *Biochim. et Biophys. Acta*. 2008. Vol. 1167. P. 272–280.
 227. Richards J.G., Playle R.C. Cobalt binding to gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) : an equilibrium model. *Comp. Biochem. Physiol.* 1998. Vol. 119 C. P. 185–197.
 228. Rosenzweig A. Metallochaperones : bind and deliver. *Chem. Biol.* 2002. Volume 9, Issue 6. P. 673–677.
 229. Rostern N.T. The effects of some metals in acidified waters on aquatic organisms. *Fish & Ocean Opj.* 2017. Vol. 4 (4). P. 555–645.
 230. Rustenbeck I., Münster W., Lenzen S. Relation between accumulation of phospholipase A₂ reaction products and Ca²⁺ release in isolated liver mitochondria. *Biochim. et Bioph. Acta*. 1996. Vol. 1304. P. 129–138.
 231. Schlenk D., Benson W.H.. Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. London and New York : Taylor and Franchis, 2001. Vol. 1. 416 p.
 232. Shi J.S., Camus A.C. Hepcidins in amphibians and fishes : antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones. *Dev. Comp. Immunol.* 2006. Vol. 30. P. 746–755.
 233. Shiau S.Y., Su L.W. Ferric citrate is half as effective as ferrous sulphate in meeting the iron requirement of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* O. Aureus. *J. Nutr.* 2002. Vol. 133. P. 483–488.

234. Simulation of acid-base condition and copper speciation in fish gill microenvironment / Tao S., Wen Y., Long A., Dawson R. [et al.]. *Computers and Chemistry*. 2001. Vol. 25 (3). P. 215–222.
235. Singh P.B., Singh V. Impact of endosufan on the profiles of phospholipids at sublethal concentratation in the male *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Journal of Environmental Biology*. Vol. 27 (3). 2006. P. 509–514.
236. Sohal R.S., Mockett R.J., Orr W.C. Mechanisms of aging : an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radicals Biol. Med.* 2002. Vol. 33. P. 575–586.
237. Somerharju P. Lateral organisation of membrane lipids. The superlattice view. *Biochim. et Biophys. Acta*. 1999. Vol. 1440. P. 32–48.
238. Speciation of lead, copper, zinc and antimony in water draining a shooting range–Time dependent metal accumulation and biomarker responses in brown trout (*Salmo trutta* L.) / Heier L.S., Lien I.B., Stromseng A.E. [et al.]. *Science of the Total Environment*. 2009. P. 4047–4055.
239. Srivastava (Sinha) Ranjana, Punia Peyush. Effect of heavy metal on biochemical and hematological parameters in *Cyprinus carpio* and its use as a bioindicators of pollution stress. *J. Ecophysiol. Occup. Hlth.* 2011. Vol. 11. P. 21–28.
240. Stafford J.L., Belosevic M. Transferrin and the innate immune response of fish : identification of a novel mechanism of macrophage activation. *Dev. Comp. Immunol.* 2003. Vol. 27. P. 539–554.
241. Stohs S.J., Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 1995. Vol. 18. P. 321–336.
242. Stolyar O.B., Falfushinskaya G.I., Bazan O.G. System of antioxidant defence in the tissues of freshwater bivalve mollusc *Colletopterum pictinale* (Unionidae) in the conditions of native aquatic body and transplantation. *Hydrobiol. J.* 2008. Vol. 44 (3). P. 58–68.

243. Structure and expression of genes involved in transport and storage of iron in red-blooded and hemoglobin-less *Antarctic notothenioids* / Scudiero R., Trinchella F., Riggio M., Parisi E. *Gene*. 2007. Vol. 397. P. 1–11.
244. Structure and expression of transferrin gene of channel catfish, *Ictalurus punctatus* / Liu H., Takano T., Abernathy J. [et al.]. *Fish Shellfish Immunol.* 2010. Vol. 28. P. 159–166.
245. Stumm W., Morgan J.J. *Aquatic Chemistry* (3rd edn.). New York : John Wiley & Sons. 1996. – 515 p.
246. Tarasub N., Tarasub C., Ayutthaya W.D.N. Protective role of curcumin on cadmium-induced nephrotoxicity in rats. *J. Environ. Chem. Ecotox.* 2011. Vol. 3 (2). P. 17–24.
247. The chianti zebrafish mutant provides a model for erythroid-specific disruption of transferrin receptor 1 / Wingert R.A., Brownlie A., Galloway J.L. [et al.]. *Development*. 2004. Vol. 131. P. 6225–6235.
248. The effects of iron, humic acids and low pH on the gills and physiology of brown trout (*Salmo trutta*) / Peuranen S., Vuorinen P.J., Vuorinen M., Hollender A. *Ann. Zool. Fenn.* 1994. Vol. 31. P. 389–396.
249. The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport / Verboost P.M., Van Rooij J., Flik G. [et al.]. *Journal of Experimental Biology*. 1989. Vol. 145. P. 185–197.
250. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis / Li Z., Agellon L.B., Allen T.M. [et al.]. *Cell Metabol.* 2006. Vol. 3. P. 321–331.
251. The role of metallothioneins, acting individually and in mixture, in detoxification of Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Mn^{2+} in tissues of the bivalve mollusk *Anodonta cygnea* / Stolyar O.B., Grubinko V.V., Mihayliv R.L., Mischuk Y.V. *Hydrobiol. J.* 2004. Vol. 40 (5). P. 90–101.

252. Topology of inositol lipid signal transduction in the nucleus / Maraldi N.M., Zini N., Santi S. [et al.]. *J. Cell. Physiol.* 1999. Vol. 181. P. 203–217.
253. Transformation of iron species in mixing zones and accumulation on fish gills / Teien H.C., Garmo O.A., Atland A., Salbu B. *Environ. Sci. Technol.* 2008. Vol. 42. P. 1780–1786.
254. Tselepis A., Chapman M. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis : potential role of LP-associated phospholipase A₂, PAFacetylhydrolase. *Atherosclerosis*. 2002. Supplement 3. P. 57–68.
255. Ubani-Rex O.A., Saliu J.K., Bello T.H. Biochemical effects of the toxic interaction of copper, lead and cadmium on clarias gariepinus. *Journal of Health & Pollution*. 2017. Vol. 7. P. 38–48.
256. Uptake and clearance of PCB congeners in *Chamaelea gallina* : response of oxidative stress biomarkers / Rodríguez-Ariza A., Rodríguez-Ortega M.J., Marengo J.L. [et al.]. *Comp. Biochem. Physiol.* 2003. Vol. 134 C. P. 57–67.
257. US EPA (1994) Methods for determination of metals in environmental samples. Supplement I. Washington, DC, US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development (EPA-600/R-94-111). Режим доступа : www3.epa.gov/caddis/pdf/Methods_for_the_Determination_of_Metals_in_Environmental_Samples.pdf
258. US EPA. Maximum contaminant level goals and national primary drinking water regulations for lead and copper; final rule. US Environmental Protection Agency. Federal Register, 1991. Vol. 110. P. 26460–26564.
259. Valko M., Morris H., Cronin M.T. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medical Chemistry*. 2005. Vol. 12. P. 1161–1208.
260. Vance D.E., Vance J.E. Phospholipid biosynthesis in eukaryotes. *Biochem. of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 2002. Vol. 36. P. 205–232.
261. Vaskovsky V.E., Kastetsky E.V., Vasedin I.M. A universal reagent for phospholipids analysis. *J. Chromatogr.* 1985. Vol. 114. P. 129–141.

262. Vibroferrin, an unusual marine siderophore : iron binding, photochemistry and biological implications / Amin S.A., Green D.H., Frithjof C.K., Carrano C.J. *Inorg.Chem.* 2009. Vol. 48, № 23. P. 11451–11458.
263. Watanabe T., Kiron V., Satoh S. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, 1997. Vol. 151. P. 185–207.
264. Wepener V., van Vuren J.H.J., du Preez H.H. Uptake and distribution of a copper, iron and zinc mixture in gill, liver and plasma of a freshwater teleost, *Tilapia sparrmanii*. *Water SA*. 2001. Vol. 27, № 1. P. 99–108.
265. Wicklund-Glynn A. Cadmium and zinc kinetics in fish : Studies on water-borne ^{109}Cd and ^{65}Zn turnover and intracellular distribution in Minnows, *Phoxinus phoxinus*. *Pharmacol. Toxicol.* 1991. Vol. 69. P. 485–491.
266. Winterbourn M.J., McDuffett W.F., Eppley S.J. Aluminum and iron burdens of aquatic biota in New Zealand streams contaminated by acid mine drainage : effects of trophic level. *Sci. Total Environ.* 2000. Vol. 254. P. 45–54.
267. Wood Chris M., Farrell Anthony P., Brauner Colin J. Homeostasis and toxicology of essential metals edited. *Fish Physiology*. London : Academic Press. 2011. Vol. 31. Part A. P. 1–497.
268. Yamaguchi M., Kura M., Okada S. Zinc accumulation and succinate dehydrogenase activation in hepatic mitochondria of rats orally administered zinc sulfate. *Chem. pharm. Bull.* 1981. Vol. 29. P. 2370–2374.
269. Yang H., Rose N.L. Distribution of Hg in the lake sediments across the UK. *Sci. Total Environ.* 2003. Vol. 304. P. 391 – 404.
270. Zhao Lu., Xia Zhidan, Wang Fudi. Zebrafish in the sea of mineral (iron, zinc, and copper) metabolism. *Frontiers in Pharmacology*. 2014. Vol. 5. P. 1–23.
271. Zn^{2+} binding to the cytoplasmic side of *Paracoccus denitrificans* cytochrome C oxidase selectively uncouples electron transfer and proton

translocation / Kannt A., Ostermann T., Müller H. [et al.]. *FEBS Lett.* 2001. Vol. 503. P. 142–146.