

УДК 639.3:597.551.2:591.133.2:62-665.9

*І. М. Курбатова, М. Ю. Євтушенко, М. О. Захаренко,  
Л. В. Чепіль*

### **АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ ПЛАЗМИ КРОВІ КОРОПА (*CYPRINUS CARPIO*) ЗА ДІЇ АЛЬБЕНДАЗОЛУ**

Представлено результати дослідження впливу антигельмінтика альбендазолу на поведінку, зовнішні та внутрішні органи, активність ферментів плазми крові та деякі показники обміну вуглеводів і білків у дворічок коропа. Вивчено загальний вміст білка, глюкози, сечовини та холестеролу, а також лужнофосфатазну,  $\alpha$ -амілазну, аспартат- і аланінамінотрансферазну активність у плазмі крові за різної концентрації альбендазолу у воді. Отримані результати свідчать про токсичний вплив альбендазолу на коропових риб, що проявляється у значних змінах активності ферментів плазми крові та показників вуглеводно-білкового обміну у тканинах.

**Ключові слова:** *короп, плазма крові, альбендазол, лужна фосфатаза, аланін- та аспаратамінотрансфераза,  $\alpha$ -амілаза, глюкоза, сечовина, холестерол, білок.*

Серед значної кількості забруднювачів водних екосистем особливого значення останній час надають ксенобіотикам антропогенного походження, які надходять у природні водойми зі стічними водами муніципальних об'єктів та відходами тваринницьких підприємств, зокрема залишкам лікарських препаратів [3, 10, 12, 17]. Потужні тваринницькі підприємства накопичують значні об'єми стічних вод і становлять загрозу для водних об'єктів. У скидах тваринницьких об'єктів виявлено антибіотики, сульфаніламідні препарати [3, 11, 14], гормони та продукти їх біодеградації [11, 18], антигельмінтик альбендазол, концентрація якого у стічних водах становить від 6,8 до 9144 мкг/дм<sup>3</sup>, а у воді ставу-накопичувача — 8,3 мкг/дм<sup>3</sup> [3].

Альбендазол (метил[6-(пропілтіо)-1н-бензімідазол-2-іл]карбамат) є синтетичним препаратом, в основі його молекули лежить кільце бензімідазолу, до якого приєднано залишок ацетату та меркаптану [9]. Він викликає дегенеративні зміни клітинних мембран шляхом гальмування процесу полімеризації тубуліна, що веде до зникнення мікротубул цитоплазми клітин паразита і його загибелі [1]. Крім того, альбендазол в організмі тварин виступає інгібітором ацетилхолінестерази та має нейротоксичну дію. Він частково ме-

© І. М. Курбатова, М. Ю. Євтушенко, М. О. Захаренко, Л. В. Чепіль, 2018

таболізується у печінці з утворенням сульфоксидальбендазолу та сульфональбендазолу [1].

Встановлено, що альбендазол має високу здатність до акумуляції, легко проникає в усі органи і тканини [6], збільшує кількість поліхроматофільних еритроцитів з мікроядрами у коропа [8], у терапевтичних дозах не впливає на загальний вміст білків, у тому числі імуноглобулінів *G* і *M*, показники гуморального імунітету, рівень глюкози та аскорбінової кислот у крові тварин [7].

Для ссавців  $LD_{50}$  альбендазолу становить 1320 мг/кг маси тіла, терапевтична доза — 10 мг/кг [9]. Гостра та хронічна токсичність альбендазолу для риб, водних безхребетних, членистоногих, рослин та водоростей не встановлені.

Оскільки альбендазол виявлено у воді ставів-накопичувачів, а його вплив на фізіологічні процеси у гідробіонтів вивчено недостатньо, актуальними є дослідження показників обміну речовин та активності ключових ферментів крові риб, які характеризують функціональний стан внутрішніх органів. Це дасть можливість поглибити уявлення про механізми впливу альбендазолу на риб, дослідити їх реакцію на дію синтетичних антигельмінтиків, що надходять у природні водойми із стоками тваринницьких підприємств.

Мета роботи — в експерименті з'ясувати вплив різних концентрацій альбендазолу у воді на деякі показники обміну речовин, поведінку, стан зовнішніх ознак та морфологічні показники внутрішніх органів дворічок коропа.

**Матеріал і методика досліджень.** Експерименти з дослідження впливу альбендазолу на показники обміну речовин у коропа проведено у науковій лабораторії кафедри загальної зоології та іхтіології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Для досліджень було використано 16 екземплярів дворічок коропа (*Cyprinus carpio* L.) масою тіла 450—500 г, вирощених у ВАТ «Київрибгосп». Риб утримували в акваріумах об'ємом 40 літрів по дві особини, підтримуючи під час досліду оптимальну температуру води (18—20°C) та вміст кисню (7—8 мг/дм<sup>3</sup>). Тривалість досліду — 72 год, риб у цей час не годували.

Перед посадкою риб у воду акваріумів вносили різну кількість альбендазолу для досягнення концентрації 0,2 (перша), 0,5 (друга) і 1,0 мг/дм<sup>3</sup> (третья дослідна група). Риби контрольної групи перебували у відстояній водопровідній воді. У процесі досліду спостерігали за поведінкою риб та контролювали кількість дихальних рухів.

Через 72 год у риб із серця відбирали кров для досліджень. Плазму отримували шляхом її центрифугування при 4,5 тис. об/хв. Досліджували також стан зовнішніх покривів тіла (луски, плавників) та зябер, а після розтину — внутрішніх органів (розмір, колір, консистенцію, наявність геморагій чи запалень) [2]. Вміст загального білка у плазмі крові риб визначали за [13], вміст

глюкози, сечовини та холестеролу, активність лужної фосфатази, аланін- та аспартатамінотрансферази,  $\alpha$ -амілази контролювали за методами [4]. Статистичну обробку результатів досліджень здійснено за допомогою комп'ютерної програми в M Excel 2000 з використанням критерія Стьюдента [5].

### *Результати досліджень та їх обговорення*

Дослідженнями встановлено, що короткотривале (72 год) перебування коропів у воді з дослідженою концентрацією альбендазолу не змінювало їх поведінку і не впливало на кількість дихальних рухів. Стан зовнішніх покривів тіла — луски, а також плавців, зябрових кришок, голови, очей, ротового отвору, а також розмір, колір, консистенція внутрішніх органів, а саме гепатопанкреасу, слизової оболонки кишечника, нирок, зябрових пелюсток у дворічок коропа дослідних груп не відрізнялись від контролю. Відсутність змін морфологічних показників, ймовірно, пов'язана з незначною дозою антигельмінтика та його нетривалим впливом на рибу. Однак, незважаючи на відсутність змін зовнішніх ознак, альбендазол впливав на обмін білків і вуглеводів.

У коропів другої дослідної групи (0,5 мг/дм<sup>3</sup>) навіть за нетривалої дії загальний вміст білків плазми крові знижувався на 15,9%, у риб третьої дослідної групи (1,0 мг/дм<sup>3</sup>) цей показник зростав на 14,4% порівняно з контролем, а першої — не змінювався (табл. 1). Зміна загального вмісту білків у плазмі крові риб другої і третьої дослідних груп пов'язана, ймовірно, з різною дозою антигельмінтика та його впливом на їх біосинтез у гепатопанкреасі [1, 6].

У риб першої дослідної групи (0,2 мг/дм<sup>3</sup>) рівень глюкози у крові був на 16,4%, другої — на 25,5, а третьої — на 35,7% нижчим, ніж у контролі (див. табл. 1), що свідчить про вплив антигельмінтика на обмін вуглеводів у гепатопанкреасі та інших тканинах шляхом зміни інтенсивності гліколізу та глюконеогенезу [7]. Отже, із підвищенням концентрації альбендазолу у воді його вплив на процеси глюконеогенезу в тканинах посилювався.

Концентрація холестеролу у плазмі крові риб другої дослідної групи порівняно з контролем була нижчою на 34,0%, третьої — майже удвічі вищою, а першої — такою самою (див. табл. 1). Тобто, за незначної концентрації у воді (0,2 мг/дм<sup>3</sup>) альбендазол не впливав, а за більш високої (0,5 і 1,0 мг/дм<sup>3</sup>) змінював вміст холестеролу, ймовірно, за рахунок його взаємодії з білками тканин, зокрема плазми крові. Це підтверджується тісним зв'язком між концентрацією альбендазолу у воді, загальним вмістом білків і холестеролу у плазмі крові коропів дослідних груп.

Альбендазол також впливав на вміст сечовини у плазмі крові риб. Її вміст у особин першої дослідної групи був на 9,6%, другої — на 21,4% вищим, а третьої — на 10,9% нижчим, ніж у контролі. Отже, за концентрації альбендазолу у воді 0,2 і 0,5 мг/дм<sup>3</sup> реакції уреогенезу в гепатопанкреасі коропів посилювались, а за більш високої — гальмувались, що впливало на вміст сечовини, що є важливим регулятором осмотичних функцій у риб.

**1. Загальний вміст білка, глюкози, сечовини та холестеролу у плазмі крові коропа за різної концентрації альбендазолу у воді,  $M \pm m, n = 4$**

Концентрація альбендазолу у воді, мг/дм <sup>3</sup>	Показники			
	білок, г/л	глюкоза, ммоль/л	холестерол, ммоль/л	сечовина, ммоль/л
Контроль	20,28 ± 0,69	4,40 ± 0,02	10,25 ± 0,6	0,73 ± 0,03
0,2	20,95 ± 0,23	3,68 ± 0,08*	10,75 ± 0,33	0,80 ± 0,03*
0,5	17,05 ± 0,38*	3,28 ± 0,06*	6,75 ± 0,21*	0,88 ± 0,06*
1,0	23,20 ± 0,43*	2,83 ± 0,04*	19,75 ± 0,38*	0,65 ± 0,06*

\*  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем.

**2. Активність ферментів у плазмі крові коропа за різної концентрації альбендазолу у воді, мкмоль/мг·год,  $M \pm m, n = 4$**

Концентрація альбендазолу у воді, мг/дм <sup>3</sup>	Активність			
	$\alpha$ -амілазна, У/І	аспартатаміно-трансферазна	аланінаміно-трансферазна	лужно-фосфатазна
Контроль	57,25 ± 0,74	329,75 ± 17,11	18,25 ± 0,53	19,25 ± 1,36
0,2	27,5 ± 0,89*	266,50 ± 3,55*	5,50 ± 0,59*	16,74 ± 0,56*
0,5	33,0 ± 1,07*	510,00 ± 11,13*	6,25 ± 0,68*	40,50 ± 0,89*
1,0	30,5 ± 0,18*	512,25 ± 15,24*	8,50 ± 0,41*	30,00 ± 0,71*

Відомо, що  $\alpha$ -амілазна активність плазми крові свідчить про функціональний стан гепатопанкреаса риб. У плазмі крові особин першої, другої і третьої дослідних груп активність  $\alpha$ -амілази була відповідно на 52,0, 42,4 і 46,7% нижче, ніж у контролі, що підтверджує вплив альбендазолу на функціональну активність гепатопанкреаса (табл. 2).

На посилення детоксикаційної функції гепатопанкреаса риб дослідних груп у відповідь на дію альбендазолу вказує вища лужнофосфатазна активність у плазмі крові риб другої і третьої груп відповідно у 2,1 разу і на 55,8%. Отримані результати свідчать, з одного боку, про токсичний вплив альбендазолу на риб, а з іншого — вказують на важливу роль ферментів у механізмах адаптації риб до дії ксенобіотиків.

Оскільки лужна фосфатаза каталізує реакції розщеплення фосфорорганічних сполук у тканинах, то зміна її активності у плазмі крові риб може бути пов'язана із гальмуючим впливом альбендазолу на гідролітичні процеси. Активність лужної фосфатази крові риб часто використовують як показник ураження печінки за дії токсикантів [15, 16]. Значні зміни аланін- та аспартатамінотрансферазої активності плазми крові коропів дослідних груп також вказують на токсичний вплив альбендазолу. Встановлено, що аланінамінотрансферазна активність у риб першої дослідної групи була у 3,3 разу, другої — у 2,9 і третьої — у 2,1 разу нижче, ніж у контролі (див. табл.

2). Аспаратаминотрансферазна активність у риб другої групи була на 50, а третьої — на 55% вище, що підтверджує попередній висновок про токсичний вплив високої концентрації альбендазолу на гепатопанкреас. За таких умов може відбуватись руйнування гепатоцитів з наступним виходом ферментів у міжклітинну рідину, а з неї у кров і, як наслідок, підвищення активності аланін- та аспаратаминотрансферази плазми [16]. У той же час у особин першої групи аспаратаминотрансферазна активність плазми крові риб була на 19% нижче, ніж у контролі.

### Висновки

Отже, на підставі проведених досліджень можна дійти висновку, що альбендазол у концентрації 0,2, 0,5 і 1,0 мг/дм<sup>3</sup> за нетривалої експозиції не впливає на поведінку і морфологічні показники риб, але змінює вміст глюкози, холестеролу, сечовини і білка,  $\alpha$ -амілазну, лужнофосфатазну, аланін- та аспаратаминотрансферазну активність плазми крові риб залежно від дози. Результати досліджень підтверджують важливу роль ферментів та метаболітів вуглеводно-білкового обміну у механізмах адаптації корошових риб до дії ксенобіотиків антропогенного походження, зокрема антигельмінтика альбендазолу.

\*\*

*Представлены результаты исследования влияния антигельминтика альбендазола на поведение, внешние и внутренние органы, активность энзимов плазмы крови и некоторые показатели обмена углеводов и белков у двухлеток карпа. Изучено общее содержание белка, глюкозы, мочевины и холестерина, а также щелочнофосфатазную,  $\alpha$ -амилазную, аспарат- и аланинаминотрансферазную активность в плазме крови карпа при различной концентрации альбендазола в воде. Полученные результаты свидетельствуют о токсическом влиянии альбендазола на карповых рыб, что проявляется в значительных изменениях активности энзимов плазмы крови и показателей углеводно-белкового обмена в тканях.*

\*\*

*The results of study of antihelmintic albendazole on behavior, external and internal organs, the activity of plasma enzymes and some indicators of carbohydrates and proteins metabolism in two-year-old carp are presented. Total content of protein, glucose, urea and cholesterol, as well as alkaline phosphatase,  $\alpha$ -amylase, aspartate and alanine aminotransferase enzymatic activity in plasma at different concentrations of albendazole in water has been studied. Obtained results testify to the toxic effect of albendazole on carp fishes, which is manifested as significant changes of the activity of plasma enzymes and parameters of carbohydrate-protein metabolism in tissues.*

\*\*

1. Архипов И.А. Антигельминтики: фармакология и применения. — М.: Изд-во Рос. акад. сельхоз. наук, 2009. — 409 с.
2. Баклашова Т.А. Практикум по ихтиологии. — М.: Агропромиздат, 1990. — 223 с.
3. Иванова О.В. Гігієнічні показники стоків свинарських підприємств за біологічних способів очистки // Наук. вісн. Львів. нац. ун-ту вет. медицини та біотехнології. — 2013. — № 3. — С. 335—341.

4. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. — Минск: Беларусь, 2000. — 463 с.
5. Кокунин В.А. Статистическая обработка при малом числе опытов // Укр. биохим. журн. — 1975. — Т. 47, № 6. — С. 776—790.
6. Куцан О.Т. Ефективність застосування альбендазолу за умов ботріоцефальної інвазії коропа та фармакокінетика препарату в органах і тканинах риб // Вет. медицина. — 2008. — Т. 90, № 10. — С. 285—289.
7. Приходько Ю.О. Вплив альбендазолу на білковий і вуглеводний обмін та стан гуморального імунітету у свиней // Там же. — 2000. — Т. 78, № 2. — С. 176—181.
8. Тафійчук Р.І. Аналіз частоти мікроядер в еритроцитах крові коропа за дії антигельмінтиків // Наук. вісн. Львів. нац. ун-ту вет. медицини та біотехнології. — 2008. — Т. 10, № 3. — С. 250—253.
9. Халиков С.С., Халиков М.С., Метелева Е.С и др. Механохимическая модификация свойств антигельминтных препаратов // Химия в интересах устойчивого развития. — 2011. — № 19. — С. 699—703.
10. Belfroid A.C., Horst A., Vander Vethaak A.D. et al. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands // Sci. Tot. Environ. — 1999. — Vol. 225. — P. 101—108.
11. Bradley P., Barber F., Cray J. Biodegradation of 17-estradiol, estrone and testosterone in stream sediments // Environ. sci. technol. — 2009. — Vol. 43, N 13. — P. 1902—1910.
12. Ching-Hua H., Sedlak D.L. Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas spectrography (tandem mass spectrometry) // Environ. toxic. chem. — 2001. — Vol. 20. — P. 133—139.
13. Gornely S. Determination of serum protein by mean of biuret reaction // J. Biol. Chem. — 1949. — Vol. 177. — P. 751—755.
14. Gulkowska A., Leung H.W., Yamashita N. Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Sheuzhen, China // Water Res. — 2008. — Vol. 42. — P. 395—403.
15. Palanisamy P. Activity levels of phosphates of the air-breathing catfish *Mystus cavasius* exposed to electroplating industrial effluent chromium // Biology and Medicine. — 2012. — Vol. 4, N 2. — P. 60—64.
16. Sreekala G. Biochemical markers and histopathology of the target tissues of *Labeo rohita* reared in freshwater lakes of Bangalore Karnataka // Ind. J. Res. Environ. Sci. Toxicol. — 2013. — Vol. 2. — P. 43—52.
17. Tanaka H., Yakou Y., Takahashi A. et al. Evaluation of environmental estrogens in Japan // Water Sci. Technol. — 2001. — Vol. 51. — P. 632—651.
18. Yasojima M., Kobayashi Y., Nakacva N. et al. Behavior of human antibiotics in wastewater treatment plants // Environ. Eng. Res. — 2005. — Vol. 42. — P. 358—368.