

УДК 639.3:597.551.2:591.133.2:62-665.9

І.М. КУРБАТОВА, д. б. н., доцент,
Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 19, м. Київ, 03041, Україна
e-mail: innakurbatova@ukr.net
ORCID 0000-0002-7333-7371

М.О. ЗАХАРЕНКО, д. б. н., професор,
Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 19, м. Київ, 03041, Україна
e-mail: sangin1996@ukr.net
ORCID 0000-0001-7055-9086

Л.В. ЧЕПІЛЬ, к. с.-г. н., доцент,
Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 19, м. Київ, 03041, Україна
e-mail: chepil2017@ukr.net
ORCID 0000-0002-2889-5446

Л.В. ШЕВЧЕНКО, д. вет. н., професор,
Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 19, м. Київ, 03041, Україна
e-mail: shevchenko_laris@ukr.net
ORCID 0000-0001-7472-4325

ФЕРМЕНТАТИВНА АКТИВНІСТЬ ЗЯБЕР КОРОПА (*CYPRINUS CARPIO L.*) ЗА ДІЇ СУЛЬФАНІЛАМІДУ ТА НАНДРОЛОНУ

Досліджено вплив анаболічного стероїду нандролону та антибактеріального засобу сульфаніламід на ферментативну активність зябер дворічного коропа. Виявлено, що нандролон та сульфаніламід, які додані у воду у різних концентраціях, не впливають на морфологічні показники внутрішніх органів, стан зовнішніх покривів тіла та поведінку риб, але змінюють ферментативну активність зябер дворічок коропа. Сульфаніламід за концентрації у воді 1,10 і 6,30 мг/дм³ та при експозиції риб протягом 72 год знижував порівняно з контролем лужнофосфатазну активність зябер на 26,7 % відповідно і не впливав на аланін- та аспаратамінотрансферазну активність цього органу. У риб за концентрації нандролону у воді акваріума 0,1 мг/дм³ лужно-фосфатазна активність зябер знизилась на 15,4 %, а за вмісту 1,0 мг/дм³ — на 23 % порівняно з контролем, однак аланін- та аспаратамінотрансферазна активність не змінювалась. Одержані результати вказують на важливу роль лужної фосфатази зябер риб в оцінці впливу таких ксенобіотиків, як сульфаніламід та нандролон, на організм прісноводних риб.

Ключові слова: короп, зябра, сульфаніламід, нандролон, лужна фосфатаза, аланін- та аспаратамінотрансферазна активність.

Ц и т у в а н н я: Курбатова І.М., Захаренко М.О., Чепіль Л.В., Шевченко Л.В. Ферментативна активність зябер коропа (*Cyprinus carpio L.*) за дії сульфаніламід у та нандролону. *Гідробіол. журн.* 2020. Т. 56. № 5. С. 63—70.

Антропогенний вплив на водні екосистеми, зокрема, пов'язують із скидом у природні водойми значної кількості забруднювачів води в результаті діяльності промислових підприємств, а також стічних вод очисних споруд тваринницьких об'єктів, що є наслідком використання великої кількості води в технологічних процесах і утворення великих обсягів рідких відходів. Із стічними водами тваринницьких підприємств у природні водойми потрапляє велика кількість різних ксенобіотиків ендегенного походження, в тому числі засоби лікування та профілактики хвороб, стимулятори продуктивності тварин [4, 9, 14].

Негативний вплив стічних вод тваринницьких підприємств на гідробіонтів залежить також від наявності у воді стероїдних гормонів та продуктів їхнього перетворення, залишків антибіотиків, сульфаніламідних препаратів, антигельмінтиків та ряду інших токсичних сполук [19, 22]. Вплив ксенобіотиків стічних вод тваринницьких об'єктів на гідробіонтів проявляється у гальмуванні розвитку ікри та ембріонів риби [8], порушенні функціонального стану органів і тканин [13], зміні антистресових механізмів [9], впливі на активність ферментів [7, 15] та енергетичні процеси в клітині [15, 16], зміні фракційного складу білків плазми крові [10].

Виявлені у стічних водах тваринницьких підприємств залишки багатьох сульфаніламідних препаратів, похідних сульфонаміду, є наслідком їхнього широкого застосування у тваринництві завдяки здатності пригнічувати розвиток різних видів бактерій і проявляти активність до великих вірусів. Це сприяє накопиченню цих сполук у стічних водах, де їхня концентрація може досягати 73,7 мкг/дм³ [2, 4]. Однак, вплив цієї групи речовин на гідробіонтів практично не досліджено.

Особливе занепокоєння останнім часом викликає також виявлення у воді річок ряду естрогенів та андрогенів і їхніх кон'югатів, серед яких знайдено 19-нортестостерон (нандролон) та продукти його деградації — 19-норадростерон, 19-норетіхоланолон та 5-дигідро-19-нортестостерон. Більшість із них є синтетичними стероїдами, що широко використовуються як терапевтичні засоби, а також як стимулятори продуктивності тварин [3, 12, 20].

Вказані сполуки знайдено у воді природних водойм у концентрації 43,3 мкг/дм³ [3]. Вони змінюють фізіологічні функції тварин, зокрема у риби порушують процеси розмноження, впливають на статевий поліморфізм, викликають морфологічні зміни у деяких органах [3, 23].

Контроль за ферментативною активністю зябер та гормональним фоном гідробіонтів дозволяє вже на ранніх стадіях виявити негативний вплив ксенобіотиків на стан водної екосистеми [23]. Важливу роль в оцінці екологічного стану водойм надають і іншим біохімічним показникам риби, особливо за дії антропогенних чинників [11].

Одним із таких діагностичних тестів при забрудненні води ксенобіотиками є активність лужної фосфатази зябер у риби [17, 25]. Навіть незначне коливання рівня токсикантів у водному середовищі впливає на активність цього ферменту у прісноводних кісткових риби [21].

Що ж до впливу різних концентрацій сульфаніламідів та нандролону, які знайдено у стічних водах тваринницьких підприємств, на рибу, то їхня дія в першу чергу проявляється у впливі на зябровий апарат, зокрема на процеси дихання. Тому дослідження впливу цих ксенобіотиків на активність низки ферментів зябер риби дасть можливість поглибити уявлення про механізми їхньої адаптації до них, встановити ГДК цих сполук у воді.

Метою роботи є дослідження впливу сульфаніламідів та нандролону на лужнофосфатазну, аланін- та аспаратамінотрансферазну активність зябер дворічок коропа.

Матеріали і методика досліджень

Досліди проведено на кафедрі загальної зоології та іхтіології Національного університету біоресурсів і природокористування України. В експериментах використовували коропів (*Cyprinus carpio* L.), середньою масою тіла 450—500 г, яких утримували в акваріумах об'ємом 40 дм³ по дві особини в кожному протягом 72 год.

В першій серії дослідів, в якій вивчали вплив різної концентрації сульфаніламідів у воді на ферментативну активність зябер коропа, було використано 16 риби, по 4 у кожній групі. Сульфаніламід (фірми Sigma Aldrich) додавали у воду акваріума перед посадкою риби, створюючи концентрацію 1,10 мг/дм³ — перша, 3,15 мг/дм³ — друга і 6,30 мг/дм³ — третя дослідна група. У воду акваріума риби контрольної групи сульфаніламід не вносили. Утримували рибу у відстояній водопровідній воді, яку під час досліду аерували та підтримували в ній вміст кисню в межах 6,5—7,5 мг/дм³, температуру — 18—20 °С, а величину рН на рівні 7,6—7,8.

В другій серії експериментів досліджували вплив різної концентрації нандролону у воді на ферментативну активність зябер дворічок коропа. З цією метою у воду акваріумів вносили нандролон (Sigma-Aldrich) до концентрації 0,1, 0,5 і 1,0 мг/дм³. У воду акваріума, в якій утримували рибу контрольної групи, нандролон не вносили.

Через 72 год досліду риби контрольної та дослідних груп забивали, видаляли зябра та відбирали печінки, з яких готували гомогенат (співвідношення 1:1), який використовували для досліджень ферментативної активності. Контролювали також стан внутрішніх органів риби, які видаляли після забою коропів. Морфологічні показники внутрішніх органів коропів визначали за загальновідомими методами [5].

Вміст білка у гомогенаті зябер визначали за [18], а лужно-фосфатазну, аланін- та аспаратамінотрансферазну активність контролювали за методами, описаними В.С. Камишніковим [5].

Результати досліджень оброблено статистично з використанням критерія Ст'юдента та спеціальної програми в MS Excel [6].

Результати досліджень та їх обговорення

Короткотермінове перебування коропів дворічного віку у воді з концентрацією сульфаніламідів 1,10, 3,15 і 6,30 мг/дм³ не змінювало поведінку

риб, кількість дихальних рухів та морфологічні показники внутрішніх органів. Стан зовнішніх покривів тіла — луски, плавників, очей, ротового отвору, а також розмір, колір і консистенція внутрішніх органів, а саме — гепатопанкреасу, слизової оболонки кишечника, нирок, а також зябрових пелюсток у риб дослідних груп не відрізнялись від контролю. Однак сульфаніламід у досліджуваних концентраціях у воді впливав на дихальний апарат риб — зябра. Встановлено зниження лужнофосфатазної активності пелюсток зябер у риб першої та третьої дослідних груп на 26,7 % порівняно з контролем (табл. 1). У риб другої групи цей показник залишився на рівні контролю.

Одержані результати вказують на те, що сульфаніламід у концентрації 1,10 мг/дм³ та її підвищенні до 6,30 мг/дм³, навіть за нетривалої експозиції, впливає на перебіг метаболічних процесів у зябрах дворічок коропа.

Оскільки відомо, що лужна фосфатаза є одним із ключових ферментів тканин риб, зміна її активності вказує на вплив сульфаніламіду на

Таблиця 1
Ферментативна активність зябер коропа за різної концентрації сульфаніламіду у воді, $M \pm m$, $n = 4$

Концентрація сульфаніламіду у воді, мг/дм ³	Активність		
	аспартат-аміотрансферазна, мкмоль/мг білку/хв.	аланін-аміотрансферазна, мкмоль/мг білку/хв.	лужно-фосфатазна, мкмоль/мг білку/год
Контроль	2,02±0,03	2,21±0,02	1,50±0,060
1,10	2,13±0,02	2,22±0,02	1,12±0,009*
3,15	2,04±0,01	2,10±0,03	1,41±0,033
6,30	2,11±0,02	2,10±0,01	1,10±0,076*

Примітка. Тут и у табл. 2: * достовірна різниця ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

Таблиця 2
Ферментативна активність зябер коропа за різної концентрації нандролону у воді, $M \pm m$, $n = 4$

Концентрація сульфаніламіду у воді, мг/дм ³	Активність		
	аспартат-аміотрансферазна, мкмоль/мг білку/ хв.	аланін-аміотрансферазна, мкмоль/ мг білку/ хв.	лужно-фосфатазна, мкмоль/мг білку/год
Контроль	2,11±0,01	2,11±0,11	1,31±0,018
0,1	2,20±0,14	2,11±0,11	1,11±0,014*
0,5	2,07±0,05	1,99±0,27	1,22±0,027
1,0	2,10±0,01	2,04±0,01	1,01±0,020*

деякі ланки метаболізму і проникливість мембран, процеси росту та диференціації клітин, стероїдогенезу тощо [21, 25].

Інгібування активності лужної фосфатази зябер коропа сульфаніламідом може бути однією із реакцій риб на дію ксенобіотика і є наслідком гідратації тканин через порушення електролітичного балансу [12, 17]. Навіть незначне коливання рівня токсикантів у водному середовищі відображається на активності цього ферменту у прісноводних кісткових риб [1]. Оскільки лужна фосфатаза чутлива до вмісту у воді токсикантів, її використовують як надійний індикатор хімічного стресу у риб [24].

В той же час сульфаніламід, доданий у воду акваріума, не впливав на аланін- та аспартатамінотрансферазну активність пелюсток зябер дворічок коропа. Її значення у коропів першої, другої та третьої дослідних груп, незважаючи на підвищення концентрації сульфаніламіду у воді з 1,10 до 6,30 мг/дм³, залишалось на рівні контролю. Це може бути пов'язане з нетривалою дією сульфаніламіду на риб та його концентрацією у воді.

Дія гормонів на риб пов'язана з їхнім впливом на метаболічні процеси у тканинах шляхом зміни активності низки ензимів, зокрема у зябрах. Витримування коропів у воді акваріума з концентрацією нандролону 0,1, 0,5 і 1,0 мг/дм³ не мало суттєвого впливу на їхню поведінку, стан зовнішніх покривів тіла та морфологічні показники внутрішніх органів.

Нандролон у досліджуваних концентраціях у воді практично не змінював активність аланін- та аспартатамінотрансферази пелюсток зябер риб (табл. 2).

Активність цих ферментів пелюсток зябер у коропів дослідних груп за дії нандролону не відрізнялась від контролю, як і у випадку із сульфаніламідом.

Однак нандролон, як і сульфаніламід, доданий у воду, значною мірою змінював лужно-фосфатазну активність зябер коропа. Встановлено, що лужно-фосфатазна активність пелюсток зябер у риб першої та третьої дослідних груп знизилась відповідно на 15,4 та 23 % порівняно з контролем (див. табл. 2). Одержані дані свідчать про вплив нандролону на інтенсивність процесів дихання у риб, які відбуваються через зябра за участю низки ензимів [24].

Зміна активності лужної фосфатази зябер за дії нандролону може впливати, ймовірно, і на трансмембранні процеси, які пов'язані із дихальною функцією цього органу риб [21].

Отже, одержані результати досліджень свідчать про те, що нандролон у концентрації 0,1 і 1,0 мг/дм³ за нетривалої дії знижує лужно-фосфатазну активність пелюсток зябер дворічок коропа, впливаючи на функціональну активність цього органу риб.

Висновки

На основі проведених досліджень показано, що ксенобіотик сульфаніламід, який додавали у воду у концентрації 1,10 і 6,30 мг/дм³, знижує лужнофосфатазну і не впливає на аланін- та аспартатамінотрансферазну

активність пелюсток зябер дворічок коропа, що може бути одним із діагностичних тестів забруднення водних об'єктів сульфаніламідними препаратами.

Встановлено, що лужнофосфатазна активність пелюсток зябер коропів дворічного віку при додаванні у воду гормону нандролону у концентрації 0,1 і 1,0 мг/дм³ за нетривалої дії знижується, а аланін- і аспартамінотрансферазна активність не змінюється. Одержані результати свідчать про негативний вплив сульфаніламідних препаратів і синтетичних гормонів, які потрапляють у природні водойми із стоками тваринницьких підприємств, на фізіологічні процеси в організмі коропових риб.

Перспективою подальших досліджень може бути вивчення впливу сульфаніаміду та нандролону на резистентність риб, що дасть можливість поглибити розуміння механізмів їхньої адаптації до дії ксенобіотиків, які потрапляють у природні водойми із стічними водами тваринницьких підприємств, та використати одержані результати для екологічної характеристики ставків рибогосподарського призначення.

Список використаної літератури

1. Баклашова Т.А. Практикум по ихтиологии. Москва, 1990. 223 с.
2. Дорогов С.М. Фармакология. Харків, 2002. 280 с.
3. Іванова О.В. Гігієнічна оцінка стоків свинарських підприємств за вмістом лікарських препаратів та стероїдних гормонів: Автореф. дис. ... канд. вет. наук. Київ, 2014. 21 с.
4. Іванова О.В., Захаренко М.О. Санітарно-гігієнічна оцінка стоків тваринницьких підприємств. *Ветеринарна біотехнологія*. 2010. № 17. С. 82—87.
5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Минск, 2000. 463 с.
6. Кокунин В.А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов. *Укр. биохим. журн*, 1975. № 6. С. 776—790.
7. Курбатова І.М., Михальська В.М., Малюга Л.В., Гайова Л.В. Активність ферментів у гепатопанкреасі коропа (*Suaprinus carpio* L.) за дії сульфаніаміду. *Біол. вісник Мелітоп. держ. пед. ун-ту*. 2016. № 6 (3). С. 377—382.
8. Курбатова І.М., Цедик В.В., Свириденко Н.П. Розвиток ікри та виживання ембріонів коропа за дії альбендазолу. *Наук. вісн. НУБіП України*. 2013. № 193. С. 127—131.
9. Мудра А.Є., Фальфушинська Г.І., Столяр О.Б. Інтегральний аналіз стану антистресорних систем гепатоцитів прісноводних тварин за дії пошкоджуючих чинників середовища. *Наук. зап. Терноп. пед. ун-ту*. 2008. № 2 (36). С. 151—160.
10. Мурадова Г.Р., Рабаданова А.И. Динамика содержания белков в сыворотке крови сеголеток карпа при хроническом воздействии тяжелых металлов. *Успехи совр. естествознания*. 2012. № 7. С. 58—62.
11. Руднева И.Н. Применение биомаркеров рыб для экологической диагностики водной среды. *Риб. хоз-во України*. 2006. Вип. 1. С. 20—23.
12. Северин Е.С., Алейникова Т.Л., Осипов Е.В., Силаева С.А. Биологическая химия. Москва, 2008. 364 с.
13. Цедик В.В., Курбатова І.М., Кононенко Р.В. Морфологічні показники коропа (*Suaprinus carpio* L.) за дії стічних вод. *Наук. вісник Львів. нац. ун-ту ветеринарії та біотехнології*. 2009. № 2 (4), С. 310—314.
14. Цудзевич Б. О., Столяр О. Б., Калінін І. В., Юкало В. Г. Ксенобіотики: накопичення, детоксикація та виведення з живих організмів. Тернопіль, 2012. 384 с.

15. Barreteau H., Simcic M., Sink R., Cesar J. Second-generation sulfonamide inhibitors of d-glutamic acid-adding enzyme: activity optimisation with conformationally rigid analogues of d-glutamic acid. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011. № 7. P. 2880—2894.
16. Çetinkaya Y., Göçer H., Menzek, Gülçin I. Synthesis, antioxidant, and antiacetylcholinesterase activities of sulfonamide derivatives of dopamine-related compounds. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2013. N 11. P. 783—792.
17. Gabriel U.U., Akinrotimi O.A., Ariweriokuma V.S. Changes in metabolic enzymes activities in selected organs and tissue of *Clarias gariepinus* exposed to cypermethrin. *J. Environ. Engineering and Technology*. 2012. N 2. P. 13—19.
18. Gornely S. Determination of serum protein by mean of biuret reaction. *J. Biol. Chemistry*, 1949. N 177. P. 751—755.
19. Gulkowska A., Leung H.W., So M.K. Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shezhen, China. *Water research*. 2008. N 42 (1—2). P. 395—403.
20. Ivanova A., Zakharenko N. Sanitary-hygiene valuation of waste water livestock enterprises. *Veterinary Biotechnology*. 2010. N 18. P 77.
21. Palanisamy P., Sasikala G., Mallikaraj D. et al. Activity levels of phosphatases of the air-breathing catfish *Mystus cavasius* exposed to electroplating industrial effluent chromium. *Biology and Medicine*. 2012. N 2. P. 60—64.
22. Patel D., Jain M., Shah S., Bahe R. Discovery of potent, selective and orally bioavailable triaryl-sulfonamide based PTP1B inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2012. N 2. P 1111—1117.
23. Sancho E., Fernandez-Vega C., Ferrando M.D., Andreu-Moliner E. Eel ATPase activity as biomarker of thiobencarb exposure. *Ecotoxicology of Environmental Safety*. 2003. N 56. P. 434—441.
24. Sreekala G., Raghuprasad S., Bela Zutshi G. Biochemical markers and histopathology of the target tissues of *Labeo rohita* reared in freshwater lakes of Bangalore, Karnataka. *India J. Res. Environ. Sci. and Toxicol.* 2013. N 2 (2). P. 43—52.
25. Yadav R., Singh D., Sing S., Singh A. Metabolic changes in fresh water fish *Channa punctatus* due to Stem bark Extract of *Croton tiglium*. *J. Biol. Sci.* 2003. N 14. P.1223—1228.

Надійшла 22.01.2020

I.M. Kurbatova, Dr. Sci. (Biol.), Prof.,
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
Geroev Oborony, 19, Kyiv, 03041, Ukraine
E-mail: innakurbatova@ukr.net
ORCID 0000-0002-7333-7371

M.O. Zakharenko, Dr. Sci. (Biol.), Prof.,
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
Geroev Oborony, 19, Kyiv, 03041, Ukraine
E-mail: zakharenko_mo@nubip.edu.ua
ORCID 0000-0001-7055-9086

L.V. Chepil, PhD (Agricultural), Associate Prof.,
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
Geroev Oborony, 19, Kyiv, 03041, Ukraine
E-mail: chepil2017@ukr.net
ORCID 0000-0002-2889-5446

L.V. Shevchenko, Dr. Sci. (Veterinary), Prof.,
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
Geroev Oborony, 19, Kyiv, 03041, Ukraine
E-mail: shevchenko_laris@ukr.net
ORCID 0000-0001-7472-4325

ENZYMATIC ACTIVITY OF THE CARP GILLS (*CYPRINUS CARPIO* L.) UNDER EFFECT OF SULPHANILAMIDE AND NANDROLLINE

The influence of anabolic steroid nandrolone and an antibacterial agent of sulfanilamide in the water on the enzymatic activity of two-year-old carps is investigated. It has been found that nandrolone and sulfanilamide added to water in different concentrations do not affect the morphological indices of the internal organs, the state of the outer surfaces of the body and the behavior of the fish, but alter the enzymatic activity of the two-year old carp gills. Sulfanilamide at concentrations in the water was 1.10 and 6.30 mg/dm³ and at exposures of fish for 72 h compared with the control reduced the alkaline phosphatase activity of the gills by 26.7 %, respectively, and did not affect the alanine and aspartate aminotransferase activity of the given organ. In fish, at concentrations of nandrolone in a water of 0.1 mg/dm³, alkaline phosphatase activity of gills decreased by 15.4 %, while the content of 1.0 mg/dm³ was 23 % compared to control, however, the alanine and aspartate aminotransferase activities were not changed. The obtained results indicate the important role of alkaline phosphatase in fish gills in assessing the influence of such xenobiotics as sulfanilamide and nandrolone on the organism of freshwater fish.

Keywords: *carp, gills, sulfanilamide, nandrolone, alkaline phosphatase, alanine and aspartate aminotransferase activity.*