

**АНАЛІЗ БІОХІМІЧНИХ ПРОЦЕСІВ У ГЕПАТОПАНКРЕАСІ КОРОПА
ЗА ЗАБРУДНЕННЯ ВОДИ ФЕНОЛОМ****ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет****імені І. Я. Горбачевського МОЗ України» (м. Тернопіль)**

Дана робота є фрагментом науково-дослідних робіт держбюджетної теми кафедри хімії Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка «Токсикоспецифічні адаптації гідробіонтів та водних екосистем до іонів важких металів та їх регуляція», № державної реєстрації 0101U000303, в якій автор досліджував активність системи антиоксидантного захисту, гострофазну відповідь та метаболізм заліза в тканинах коропа і рака за дії іонів важких металів та фенолу.

Вступ. Проблема фенольного забруднення природних вод стала актуальною з другої половини ХХ ст. як в Україні, так і за її межами. Не втратила вона своєї актуальності й до наших днів, оскільки у скидах багатьох промислових підприємств (нафтопереробні, газові, коксобензолні, хімічні, деревопереробні, текстильні, фармацевтичні, шкіряні та ін.) містяться фенол і його гомологи, які з неочищеними або недостатньо очищеними стічними водами надходять у річки і водойми їх придаткової системи [10]. Проте, прогноз токсичності фенолів зводиться лише до вимірювання кількості його самого як у водоймі, так і в тканинах тварин [11, 12]. Щодо найпростішого гомолога фенолів C_6H_5OH відомо, що в організмі коропа він викликає істотні зміни активності ферментів антиоксидантного захисту [3]. Тому дедалі більшої уваги приділяється пошуку адекватних біомаркерів гідробіонтів. Для рекомендації біоіндикаторного виду, чутливого до фенольного забруднення водойм, ми дослідили метаболічну відповідь на дію фенолу у організмі коропа.

Мета дослідження. З'ясувати та дослідити метаболічну відповідь на показники гепатопанкреасу коропа за умов фенольного забруднення, що характеризують стан системи антиоксидантного захисту та вміст молекул середньої маси, що використовуються у клінічному аналізі гепатотоксичності.

Об'єкт і методи досліджень. Дослідження проводились на дворічках коропа лускатого (*Cyprinus carpio L.*) масою 200-250 г. Тварин вилувлювали влітку траловим методом із ставків Тернопільського обласного рибкомбінату (урочище Залісці) та адаптували до лабораторних умов протягом 7 діб у басейнах об'ємом 200 л з кількістю тварин 6-10 особин на басейн при температурі близько 18° С у відстояній, добре аерованій воді. Одна група тварин була

контрольною, іншій у воду додавали 2 мкг/л фенолу. Воду міняли що дві доби, поновлюючи в ній вміст фенолу. Період інкубації становив 14 діб. Тварин годували гранульованим кормом для риб. Всі процедури з виділення та обробки зразків проводили за температури 4 °С. Для аналізу використовували тканину гепатопанкреасу. Всі процедури з виділення й обробки зразків проводились на холоді. Всі реактиви, крім уже зазначених, були фірми «Реахим» кваліфікації «хч».

Активність супероксиддисмутази (СОД) (К.Ф.1.15.1.1) вимірювали за інтенсивністю відновлення нітротетразолію синього в присутності феназинметасульфату і НАДН [6], активність каталази (К.Ф.1.11.1.6) – за методом Королюка і співавт. [2], активність лужної фосфатази (К.Ф.3.13.1), та фосфату, загальний вміст заліза у тканині та залізо зв'язуючу здатність тканини – за допомогою стандартних наборів реактивів «Lachema», концентрацію відновленого глутатіону (небілкових тіолів) – за допомогою реактиву Еллмана [14].

Інтенсивність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за допомогою тіобарбітурової кислоти (ТБК), як утворення ТБК-активних продуктів, серед яких переважає один з кінцевих продуктів ПОЛ – малоновий діальдегід [5]. Вимірювали також вміст молекул середньої маси [4]. Для виділення загальних білків печінки їх осаджували в 20 об'ємах 0,5 н $HClO_4$, відокремлювали центрифугуванням та промивали в наступній послідовності: у 5 об'ємах етанолу, суміші метанолу і хлороформу (2:1) та у диетилвому етері. Після висушування в термостаті при 37 °С білок розчиняли в 1 мл 0,5 н КОН, витримуючи суміш декілька годин – добу в термостаті. Загальний вміст білків у печінці визначали за методом Лоури і інш., використовуючи як стандарт сироватковий альбумін («Sigma»).

Результати подавали у вигляді $M \pm m$, $n = 5$. Вірогідність відхилення двох рядів значень обчислювали з використанням t-тесту Стьюдента. За результатами визначення показників стану антиоксидантно-прооксидантної системи обчислювали інтегральний показник – коефіцієнт антиоксидантного стану (КАС) як відношення сум показників стану антиоксидантних (А) і прооксидантних (П) факторів: $КАС = J A/S П$. Кожний показник визначали за формулою:

Таблиця

Вплив забруднення води фенолом на активність ферментів та вміст метаболітів у гепатопанкреасі коропа, $M \pm m$, $n = 5$

Показник	Дослідна група	Короп
Активність супероксид-цисмутази, у. о. /мг білків	Контроль	0,68 ± 0,09
	Фенол	0,22 ± 0,02**
Активність каталази, мкат/мг білків	Контроль	0,16 ± 0,01
	Фенол	0,24 ± 0,04
Низькомолекулярні тіоли, мкмоль/г тканини	Контроль	2,2 ± 0,2
	Фенол	4,2 ± 0,4**
ТБК-активні продукти, мкмоль/г тканини	Контроль	27,4 ± 2,4
	Фенол	54,4 ± 5,3**
Вміст магнію, ммоль/г тканини	Контроль	0,79 ± 0,06
	Фенол	0,96 ± 0,01*
Вміст заліза, мкмоль/г тканини	Контроль	6,9 ± 0,5
	Фенол	8,2 ± 0,8
Загальна залізовв'язуюча здатність, мкмоль/г тканини	Контроль	23,4 ± 2,7
	Фенол	10,8 ± 1,2**
Молекули середньої маси (D_{280}), ум. од. /г тканини	Контроль	281 ± 6
	Фенол	137 ± 18**
Молекули середньої маси (D_{254}), ум. од. /г тканини	Контроль	513 ± 11
	Фенол	225 ± 11**
Активність лужної фосфатази, мкмоль фосфату/мг білків	Контроль	0,9 ± 0,2
	Фенол	0,8 ± 0,2
Фосфат неорганічний, мкг/г тканини	Контроль	5,6 ± 0,6
	Фенол	3,9 ± 0,4*
Коефіцієнт анти-оксидантного стану, % відхилення від контролю	Фенол	-6.0

Примітка: *, ** - зміни порівняно з контролем вірогідні, * - $p < 0,1$; ** - $p < 0,01$.

$1 \pm (M_d - M_k) / M_k$, де 1 – характеристика показника в нормі, M_d і M_k – середньоарифметичні значення показників відповідно дослідної і контрольної серій. До «А» відносили такі показники як активність СОД, каталази, вміст небілкових тіолів в тканині, до «ГГ» – вміст ТБК-активних продуктів та незв'язаного заліза. За такої кількості даних в контролі КАС становить 1,5.

Результати досліджень та їх обговорення. Ферменти антиоксидантного захисту та вміст відновленого глутатіону – це біохімічні параметри, які часто використовуються як біомаркери забруднення водойм в програмах біомониторингу [8, 11, 12]. Як видно з даних, наведених у таблиці, у коропа вплив фенолу викликає істотне зменшення активності СОД. Активність каталази виявилась нечутливим до дії фенолу показником, а зміни вмісту відновленого глутатіону у коропа мають протилежну спрямованість.

У коропа зростає вміст незв'язаного заліза, тоді як загальна залізовв'язуюча здатність (ЗЗЗ) зменшується майже вдвічі. Таким чином, зростання насичення клітинних мішеней залізом до наближення

значень вмісту заліза в тканині та її ЗЗЗ може свідчить про патологію печінки, тоді як, зменшення ступеню насичення клітинних білків залізом може мати адаптивний характер. Зменшення ЗЗЗ тканини може бути ознакою гіпопротеїнемії, запальних процесів у тварин за дії досліджуваних чинників.

Разом з тим, у даного об'єкта відзначене істотне посилення пероксидації ліпідів.

Згідно з обчисленнями КАС, інтегральні зміни антиоксидантно-прооксидантного статусу гепатопанкреасу коропа має прооксидантну спрямованість. Серед чинників прооксидантних змін простежується узгодженість між активністю СОД та пероксидацією ліпідів.

Нами визначались також показники, які часто використовуються у клінічному аналізі гепатотоксичності. За дії фенолу вміст молекул середньої маси у гепатопанкреасі коропа зменшувався вдвічі, що свідчить про пригнічення здатності тканини формувати так звану відповідь «гострого типу», властиву для адаптації до дії токсиканту [1, 7, 15].

Використані нами біохімічні показники, такі як вміст відновлених тіолів, магнію та фосфату, є полідетермінантними, тому аналіз причин змін або постійності їх стану за дії на організм фенолу потребує додаткових досліджень. Разом з тим, слід відзначити, що за кількістю показників, які зазнають змін коропа зазнає значного ураження. Одержані результати узгоджуються з даними про нижчий поріг токсичності фенолу для риб, ніж для інших гідробіонтів [10, 16]. Цей феномен являє інтерес для подальшого дослідження, так як для інших забруднювачів водойм саме ракоподібні та молюски виступають як більш вразливі [8].

Однаковий характер прооксидантних змін активності СОД та утворення ТБК-активних продуктів у коропа з огляду на ці спостереження може пояснюватися генерацією активних форм кисню за участю як безпосередньо фенолу, так і іонів металів, що легко вступають в окисно-відновні перетворення і діють у клітинах як Фентон-метали [9, 13, 15] за умов порушення гомеостазу під впливом фенолу.

Отже, характерною рисою токсичності фенолу для досліджених гідробіонтів є прооксидантні зміни. Використання клінічних показників не дає чітких уявлень про характер впливу фенолу на коропа. Разом з тим, визначення вмісту молекул середньої маси дозволяє оцінити більшу вразливість організму риби до дії фенолу ніж інших гідробіонтів.

Висновки. Згідно з нашими результатами для використання у біомаркуванні забруднення водойм фенолом можна рекомендувати, як тестовий організм коропа, а у якості біоіндикаторів використовувати показники антиоксидантного захисту, а також вміст молекул середньої маси у гепатопанкреасі даного виду.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення біохімічних показників гепатотоксичності у інших представників гідробіонтів, зокрема ракоподібних та молюсків за умов фенольного забруднення.

Література

1. Арцимович Н. Г. Биологически активные молекулы, ассоциированные с клетками печени / Н. Г. Арцимович, М. С. Ломакин, Д. Б. Казанский, Н. Н. Настоящая // Усп. соврем. биол. – 1991. – Т. 111, №6. – С. 932-947.
2. Кородюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Кородюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
3. Леус Ю. В. Перекисне окиснення ліпідів та антиоксидантний захист у риб під впливом факторів водного середовища : автореф. дис. на здобуття наукового ступеня канд. біол. наук : спец. 03. 00. 047 «Гідробіологія» / Ю. В. Леус. – Київ, 1998. – 16 с.
4. Николайчик В. В. Способ определения средних молекул / В. В. Николайчик В. М. Моиш, В. В. Кирковский [и др.] // Лаб. дело. – 1991. – № 10. – С. 13-18.
5. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаршивили // Современные методы в биохимии. – М. : Медицина, 1977. – С. 66-68.
6. Чевари С. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте / С. Чевари, Т. Андял, Я. Штрэнгер // Лаб. дело. – 1991. – № 10. – С. 9-13.
7. Цудзевич Б. О. Ксенобіотики: накопичення, детоксикація та виведення з живих організмів / Б. О. Цудзевич, О. Б. Столяр, І. В. Калінін, В. Г. Юкало. – Тернопіль : Вид-во ТНТУ ім. І. Пулюя, 2012. – 384 с.
8. Cajaville M. P. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach / M. P. Cajaville, M. J. Bebianno, J. Blasco [et al.] // Sci. Total Environ. – 2000. – Vol. 247. – P. 295-311.
9. Carter D. E. Oxidation-reduction reactions of metal ions / D. E. Carter // Environ. Health Perspect – 1995. -Vol. 103, № 1. – P. 17-19.
10. International programme on chemical safety «Environmental health criteria 155» [Electronical source] – <http://www.inchem.org>.
11. Lam P. K. S. Use of biomarkers in environmental monitoring / P. K. S. Lam, R. S. S. Wu // STAP Workshop on the use of bioindicators, biomarkers and analytical methods for the analysis of POPs in developing countries. – 2003. – P. 1-77.
12. Livingstone D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment / D. R. Livingstone // J. Chem. Technol. Biotechnol. – 1993. – Vol. 57. – P. 195-211.
13. Lushchak V. I. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues / V. I. Lushchak, T. V. Bagnyukova // 2. Antioxidant and associated enzymes. Comp. Biochem. Physiol. – 2006. – Vol. 143, C (1). – P. 36-41.
14. Sediak J. Estimation of total, protein-bound and non-protein sulphhydryl groups in tissue with Ellmans Reagent / J. Sediak., R. H. Lindsay // Anal. Biochem. – 1968. – Vol. 25, № 1. – P. 192-205.
15. Stoliar O. B. Environmental Pollution and Oxidative Stress in Fish. In Book: Oxidative Stress – Environmental Induction and Dietary Antioxidants / O. B. Stoliar, V. I. Lushchak // Ed. Lushchak V. In Tech. – 2012. – P. 131-166.
16. Falfushinska H. Responses of biochemical markers in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine / H. Falfushinska., O. Stolyar // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2009. – Vol. 72 (3). – P. 729-736.

УДК 615. 015**АНАЛІЗ БІОХІМІЧНИХ ПРОЦЕСІВ У ГЕПАТОПАНКРЕАСІ КОРОПА ЗА ЗАБРУДНЕННЯ ВОДИ ФЕНОЛОМ****Мудра А. Є.**

Резюме. Дослідження проводились на дворічках коропа лускатого (*Cyprinus carpio L.*) масою 200-250 г. Одна група тварин була контрольною, іншій у воду додавали 2 мг/л фенолу. Період інкубації становив 14 діб. Досліджувався вплив фенолу на антиоксидазну систему та метаболічні функції гепатопанкреаса коропа.

Згідно наших результатів, характерною рисою токсичності фенолу для досліджених гідробіонтів є прооксидантні зміни. Використання клінічних показників не дає чітких уявлень про характер впливу фенолу на коропа. Разом з тим, визначення вмісту молекул середньої маси дозволяє оцінити більшу вразливість організму риби до дії фенолу ніж інших гідробіонтів

Ключові слова: короп (*Cyprinus carpio L.*), фенол, забруднення, антиоксидазний захист, біомаркери.

УДК 615. 015**АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ГЕПАТОПАНКРЕАСЕ КАРПА ПРИ ЗАГРЯЗНЕНИИ ВОДЫ ФЕНОЛАМИ****Мудра А. Е.**

Резюме. Исследование проводилось на двухлетках карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio L.*) массой 200-250 г. Одна группа животных была контрольной, другой в воду добавляли 2 мг/л фенола. Период инкубации составлял 14 суток. Исследовалось влияние фенола на антиоксидазную систему и метаболические функции гепатопанкреаса карпа.

Согласно наших результатов, характерной чертой токсичности фенола для исследованных гидробионтов являются прооксидантные изменения. Использование клинических показателей не дает четких представлений о характере влияния фенола на карпа. Вместе с тем, определение содержания молекул средней массы позволяет оценить большую уязвимость организма рыбы к действию фенола чем других гидробионтов.

Ключевые слова: карп (*Cyprinus carpio L.*), фенол, загрязнение, антиоксидазная защита, биомаркеры.

UDC 615. 015

Analysis of the Biochemical Processes State in the Carp Haepathopancreas under the Phenol Contamination of Water

Mudra A. Ye.

Abstract. The phenol contamination problem of natural waters became actual as in Ukraine, as in other countries from the 50ies of the 20th century. It is still actual nowadays because phenol and its homologs are in the dumpings of many enterprises.

Though the phenol toxicity forecast is limited to measurement of phenol emission in water and in animal tissue. Concerning the simplest phenol homolog C_6H_5OH it's known that it provokes considerable changes of antioxidant protection enzyme activity in carp organism.

The indexes that characterize the state of antioxidant protection system and are used in clinical analysis of hepatotoxicity were taken for testing.

The investigations were carried out on carp (*Cyprinus carpio L.*) with weight of 200-250 g. The animals were caught in summer and adapted to lab conditions within 7 days. They lived in 200 litres pools with well aired water at 18 °C, the quantity of fish is 6-10 animal units. One group of fish was not treated, other was added $2.0 \mu g \cdot l^{-1}$ of phenol.

As a result of our investigation phenol influence on carp provokes considerable decrease of superoxide dismutase. Catalase became an insensible index to phenol action, but changes of renovated glutathione increased.

The main attention was paid to iron homeostasis indicators, which demonstrate significant elevation of unbound iron in the tissue in carp organism. A considerable enhancement of lipids peroxidation is marked too.

Under Index of antioxidative state calculations the integral changes antioxidant-prooxidant status of carp superoxide dismutase has prooxidant trend.

Under phenol influence of the middle mass molecules in carp haepathopancreas decreased twice that indicates the depression of tissue ability to form so-called answer of "acute type" characteristic to adaptation to toxicant action.

It must be stated that carp was hurted. Received results are agreed with data about lower threshold of phenol toxicity for fish then to other hydrocoles in the terms of aforesaid.

The same character of prooxidant changes of superoxide dismutase activity and formation of thiobarbituric acid reacting substance production can be explained by active form oxygen generation with phenol metals ions participation. The last easily started oxide-reduction transformations and act as Fenton metals if homeostasis is breaking.

So, prooxidant changes are characteristic to phenol toxicity for investigated hydrocoles. The usage of clinic indexes doesn't clear up the character of phenol influence on carp. The determination of the middle mass molecules content of gives the possibility to estimate bigger sensitiveness of fish organism to phenol action than other hydrocoles.

According to our results carp can be used as a test organism or bioindicator in biomarking of polluted waters by phenol. The measuring of the antioxidant-defense system activity and of the middle mass molecules of carp haepathopancreas have been recommended as the biomarker of phenol contamination.

Keywords: carp (*Cyprinus carpio L.*), phenol, contamination, antioxidant-defense, biomarker.

Рецензент – проф. Гапон С. В.

Стаття надійшла 21. 08. 2014 р.