

УДК 577.352.38:577.64

Г.І. ФАЛЬФУШИНСЬКА¹, Л.Л. ГНАТИШИНА¹, В.В. ДЯКОВ¹, О.О. ШУЛДИК¹, Й.К. НАМ², О.Б. СТОЛЯР¹¹Тернопільський національний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль 46027, Україна²Національний університет Пукійонгу, Бусан 608-737, Республіка Корея**СТАН МОЛЕКУЛЯРНИХ СИСТЕМ ДЕТОКСИКАЦІЇ КАРАСЯ
CARASSIUS AURATUS GIBELIO BLOCH З РІЗНИХ ПОПУЛЯЦІЙ
ЗА ДІЇ ТІОКАРБАМАТНОГО ФУНГІЦИДУ**

Здійснено порівняння адаптивної здатності карасів з двох місцевостей, умовно чистої (З) та забрудненої (Б), до дії Zn,Mn-тіокарбаматного фунгіциду (комерційний препарат ТАТТУ, 9,1 мкг/л і 91 мкг/л) протягом 14 діб. У контрольних риб Б-групи виявлено ознаки нейротоксичності, активації ферментів біотрансформації та вищий вміст кадмію у тканинах порівняно з З-групою. Дія ТАТТУ призвела до пригнічення холінестеразної активності у тварин З-групи та до активації холінестерази та глутатіон-залежної біотрансформації ксенобіотиків у тварин Б-групи, особливо у зябрах. В обох групах зменшується вміст есенціальних металів цинку, міді та марганцю в тканинах. Показники зябер, свідчать про більш успішну адаптацію риб Б-групи до дії ТАТТУ.

Ключові слова: тіокарбаматний фунгіцид, карась, нейротоксичність, біотрансформація, мідь, цинк, марганець, кадмій

Порівняльне дослідження риб з різних водойм за біохімічними маркерами дозволяє виявити суттєві відмінності між ними залежно від якості води навіть в екологічно безпечних регіонах [6, 7]. Таким показником є акумуляція важких металів у тканинах. Особливості стану молекулярних систем детоксикації та адаптації в організмі гідробіонтів, що формуються унаслідок тривалої дії пошкоджуючих чинників, можуть істотно вплинути на здатність організму реагувати на додаткове навантаження за схемою. Проте порівняльні дослідження впливу умов існування на здатність гідробіонтів забезпечувати адекватну відповідь на зміну умов існування недостатні [5-8].

Метою дослідження є порівняння меж толерантності печінки і зябер карася з двох популяцій, адаптованого до дії фунгіциду ТАТТУ.

Матеріал і методи досліджень

Досліджували карася *Carassius auratus gibelio* Bloch, який постійно піддається хронічному впливу суміші забруднювачів в низьких концентраціях. Він володіє високою екологічною пластичністю до дії ряду забруднюючих речовин [12] та широко використовується у лабораторних експериментах [15]. Тварин відбирали за станом біомаркерів [6, 7]. Токсикантом був метал-вмісний тіокарбаматний фунгіцид, вплив якого на водні організми мало досліджений і стосується переважно короткотривалих гостротоксичних тестів [13]. Фунгіцид відомий нейротоксичною дією [3], а внесок іонів металів у токсичність фунгіциду не встановлено.

Тварин відбирали з двох місцевостей: рибгосподарські ставки в урочище Залізці у верхів'ї ріки Серет (умовно чиста місцевість, З-група) та став у нижній течії ріки Нічлава, нижче м. Борщів (забруднена місцевість, Б-група), доставляли в лабораторію, де їх адаптували до лабораторних умов протягом 7 діб. Експериментальні умови створювали в басейнах об'ємом 200 дм³ з кількістю риб з розрахунку 1 особина на 40 дм³ води. Воду відстоювали і змінювали щодобово, поновлюючи вміст ТАТТУ у воді. Тварин годували комерційним кормом.

З відібраних з кожної водойми риб формували три групи для вивчення впливу фунгіциду ТАТТУ – одна контрольна, іншим у воду додавали фунгіцид. ТАТТУ є поширеним комерційним препаратом, діючими речовинами якого є пропамокарб-гідрохлорид (248 г/дм³) (C₉H₂₁ClN₂O₂) та манкоцеб (302 г/дм³), [-SCSNH(CH₂)₂NHCSSMn-] n (Zn)m з вмістом Zn і Mn 2,55 % і 18 %, відповідно. Вміст ТАТТУ складав 0,0091 (ТТ (1)) та 0,091 мг/дм³ (ТТ (2)). У досліджуваних розчинах ри витримували 14 діб.

Експерименти на тваринах здійснювались у відповідності до Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986). Відокремлювали печінку і зябра. Всі процедури по відбору і обробці тканин здійснювали на холоді. Всі реактиви, крім нижче зазначених, були фірми "Реакхим" кваліфікації "хч".

Активність холінестерази [КФ 3.1.1.7] (ХЕ) визначали колориметричним методом Елмана та ін. (1961) при 25 °С за здатністю гідролізувати ацетилтіохолін йодид. Як індикатор тіолових груп використовували дитіонітробензойну кислоту (ДТНБ) [1]. Активність глутатіонтрансферази (GST) [КФ 2.5.1.18] визначали спектрофотометрично за утворенням адуктів 1-хлоро-2,4-динітробензолу з глутатіоном [10].

Вміст металів (Cd, Zn, Cu, Mn) у тканині визначали методом атомно-адсорбційної спектроскопії після спалювання зразків у перегнаній нітратній кислоті в співвідношенні 1:5 (маса:об'єм) [6]. Вміст цинку, марганцю і міді визначали на атомно-адсорбційному спектрофотометрі С-115, кадмію – на спектрофотометрі S-600 і виражали в мкг на г сухої маси тканини.

Результати вимірів подані у вигляді $M \pm SD$ для восьми тварин дослідної групи. Вірогідність відхилення двох рядів значень обчислювали з використанням *t*-критерію Стьюдента. Порівняльний аналіз біологічних параметрів здійснювали, використовуючи комп'ютерні програми Statistica v 7.0 та Excel для Windows-2000.

Результати досліджень та їх обговорення

Одержані результати свідчать про те, що риби двох груп після аклімації до лабораторних умов істотно відрізнялись за низкою досліджуваних показників (рис. 1). Так, активність ХЕ в печінці риб була значно вищою у тварин 3-групи, ніж у Б-групі, а у зябрах – навпаки, активність GST була помітно вищою в тканинах карасів 3-групи.

Дія ТАТТУ на карасів викликала сайт- та тканино-специфічні зміни показників. Зокрема, у тварин 3-групи активність ХЕ та GST у печінці істотно зменшувалася, а у риб Б-групи – зростала порівняно з контролем. Проте, в обох групах ці показники залишались нижчими, ніж у контролі групи 3. У зябрах активність ХЕ за впливу ТАТТУ зростала у обох групах, особливо у риб Б-групи за дії високої концентрації, втричі порівняно з контролем, а активність GST – лише у групі Б. Зміни активності GST та ХЕ в печінці обох груп тварин відбуваються узгоджено, що підтверджено результатами кореляційного аналізу ($p < 0.05$).

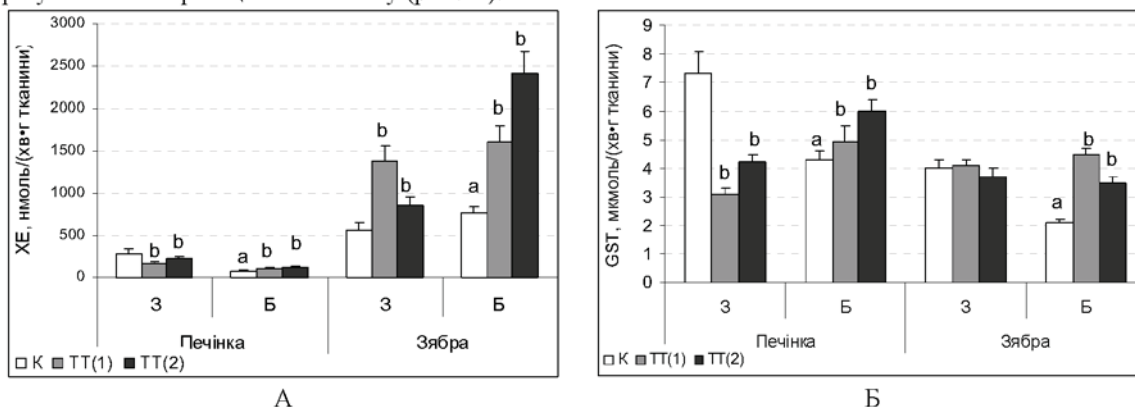


Рис. 1. Активність холінестерази (А) та глутатіон-S-трансферази (Б) в тканинах карася з двох популяцій за дії фунгіциду ТАТТУ

Примітка: тут і в таблиці: ^a – відмінності між контрольними групами тварин, ^b – зміни порівняно з контролем вірогідні, $p < 0,05$.

Вміст міді, цинку та марганцю у тканинах контрольних риб Б-групи був нижчим, а кадмію - вищим, ніж у риб 3-групи (табл.). Співвідношення кількості Zn:Cu:Mn:Cd у печінці карасів становить 56:5:2:1 та 56:3:1:2 для 3- та Б-групи відповідно. Вплив ТАТТУ на вміст металів у риб мав особливості залежно від походження риби та тканини. Вміст міді в печінці риб 3-групи помітно зменшувався, а у риб Б-групи він зростав в обох тканинах. У риб 3-групи вміст цинку та марганцю у тканині істотно зменшувався, а в групі Б не зазнавав змін. Отже, присутність фунгіциду не призводила до надлишкової акумуляції цих металів тканинами. Вміст кадмію у тканинах не зазнавав помітних змін у досліджуваних тварин, за окремими винятками. Співвідношення металів у печінці карасів з двох популяцій змінювалось на користь токсичних металів: збільшувалась частка кадмію та зменшувалась частка цинку.

Вміст важких металів у тканинах карася *Carassius auratus* з двох місцевостей, мкг/г сухої маси тканини ($M \pm SD$, $n=8$)

Показник	Група	Печінка		Зябра	
		Залізці	Борщів	Залізці	Борщів
Cu	К	14,2±2,8	8,1±0,6 ^a	15,4±2,8	9,6±1,4 ^a
	ТТ(1)	2,9±0,4 ^b	9,5±1,3	12,9±1,5	19,9±2,9 ^b
	ТТ(2)	6,2±1,4 ^b	11,1±1,5 ^b	15,6±1,0	7,7±0,8
Zn	К	168,3±23,2	139,7±7,9	712,5±39,3	601,7±25,1 ^a
	ТТ(1)	77,9±9,7 ^b	101,3±12,2 ^b	483,0±50,2 ^b	527,3±52,8
	ТТ(2)	113,4±19,1 ^b	156,5±13,8	680,8±82,7	541,6±44,5 ^b
Mn	К	6,2±1,3	2,1±0,3 ^a	14,1±2,9	25,2±1,0
	ТТ(1)	1,8±0,3 ^b	3,3±0,2 ^b	4,2±0,3 ^b	21,9±2,7
	ТТ(2)	3,3±0,5 ^b	3,0±0,3 ^b	6,6±0,7 ^b	20,6±1,6 ^b
Cd	К	5,2±0,8	7,7±0,8 ^a	3,8±0,9	7,3±0,6 ^a
	ТТ(1)	4,8±0,8	5,1±0,8 ^b	5,6±0,4 ^b	4,9±0,6 ^b
	ТТ(2)	4,8±0,4	5,4±1,1 ^b	5,5±1,0	6,3±1,0 ^b

Отже, не зважаючи на концентраційну залежність дії ТАТТУ на карася, обрані концентрації були достатньо низькими, щоби викликати типову для карбаматного фунгіциду нейротоксичність [9]. Зменшення активності ХЕ як ознака нейротоксичності, проявляється за дії ТАТТУ лише у печінці карасів 3-групи. В решті випадків відзначена неспецифічна реакція: активація ХЕ, особливо у зябрах. Очевидно, це є проявом більш успішної адаптації тварин Б-групи до дії фунгіциду та ознакою високої толерантності зябер. Наведені міркування узгоджуються з даними літератури [14].

Відомо, що вплив важких металів та органічних сполук прооксидантної природи у різних концентраціях активує GST, яка каталізує взаємодію небілкового тіолу глутатіону з молекулами електрофільних ксенобіотиків, забезпечуючи процеси біотрансформації органічних ксенобіотиків, та виконує антиоксидантну функцію [2]. В нашому дослідженні дія ТАТТУ викликала активацію GST у зябрах, що можна розглядати як демонстрацію більш успішної адаптації цих риб до токсичного середовища [4]. Разом з тим, у тварин з чистої місцевості дія ТАТТУ викликала пригнічення глутатіон-залежних детоксикаційних процесів у печінці.

Виходячи з складу препарату, можна було очікувати, що дія ТАТТУ призведе до збільшення вмісту цинку та/або марганцю метал-депонуючою тканиною печінкою. Проте у більшості випадків в нашому дослідженні спостерігався протилежний ефект. Очевидно, що дія препарату приводить до порушення транспортних і регуляторних механізмів гомеостазу металів, що у риб виявлено за комплексного забруднення водойм [11].

Проведене нами раніше порівняння жаб *Rana ridibunda* за толерантністю до препарату ТАТТУ показало що, тварини з хронічно забрудненої місцевості виявляли помітніші ознаки токсичності, а у чистій місцевості комплекс ознак указував на успішну адаптацію [5]. Така філогенетично детермінована перевага карася може бути пов'язана з винятковими морфологічними та біохімічними особливостями зябер [12].

Висновки

Риби Б-групи виявилися більш адаптованими до дії фунгіциду ТАТТУ порівняно з тваринами 3-групи, що особливо чітко простежується у зябрах. Показники метаболізму металів в печінці можуть слугувати неспецифічними ознаками токсичності середовища.

Робота виконана за підтримки МОН України в межах НДР № М/256-2008 та № М/567-2009, а також Західно-Українського Біомедичного Центру. Автори висловлюють подяку інженеру Войтюку В.Б. за допомогу у визначенні металів у біологічних зразках.

1. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity / G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. J. Andres [et al.] // Biochem. Pharmacol. – 1961. – Vol. 7. – P. 88–95.
2. A trifunctional enzyme with glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity / F. Yan, W.K. Yang, X.Y. Li [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – Vol. 1780, N 6. – P. 869–872.
3. Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction / L.M. Domico, G.D. Zeevalk, L.P. Bernard, K.R. Cooper // Neurotoxicology. – 2006. – Vol. 27, N 5. – P. 816–825.

4. *Effects of copper and its ethylenediaminetetraacetate complex on the antioxidant defenses of the goldfish, Carassius auratus* / H. Liu, W. Wang, J. Zhang, X. Wang // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* - 2006. - Vol. 65, N 3. - P. 350–354.
5. *Falfushynska H.I. Different responses of biochemical markers in frogs (Rana ridibunda) from urban and rural wetlands to the effect of carbamate fungicide* / H.I. Falfushynska, L.D. Romanchuk, O.B. Stolyar // *Compar. Biochem. Physiol.* - 2008. - Vol. 148 C, N 3. - P. 223–229.
6. *Falfushynska H.I. Function of metallothioneins in carp Cyprinus carpio from two field sites in Western Ukraine* / H.I. Falfushynska, O.B. Stolyar // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* - 2009. - Vol. 72. - P. 1425–1432.
7. *Falfushynska H.I. Responses of biochemical markers in carp Cyprinus carpio from two field sites in Western Ukraine* / Falfushynska H.I., Stolyar O.B. // *Ecotoxicol. Environ. Safety.* - 2009. - Vol. 72, N 3. - P. 729–736.
8. *Ferreira M. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (Mugil cephalus) and flounder (Platichthys flesus), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal* / M. Ferreira, P. Moradas-Ferreira, M.A. Reis-Henriques // *Aquat. Toxicol.* - 2005. - Vol. 71. - P. 39–48.
9. *Fulton M.H. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects* / Fulton M.H., Key P.B. // *Environ. Toxicol. Chem.* - 2001. - Vol. 20, N 1. - P. 37–45.
10. *Habig W.H. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation* / W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby // *J. Biol. Chem.* - 1974. - Vol. 249. - P. 7130–7139.
11. *Hanson P.J. Response of hepatic trace element concentrations in fish exposed to elemental and organic contaminants* / P.J. Hanson // *Estuaries.* - 1997. - Vol. 20. - P. 659–676.
12. *Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues* / V.I. Lushchak, T.V. Bagnyukova, V.V. Husak [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* - 2005. - Vol. 37, N 8. - P. 1670–1680.
13. *Jarrard H. E. Impacts of carbamate pesticides on olfactory neurophysiology and cholinesterase activity in coho salmon (Oncorhynchus kisutch)* / H.E. Jarrard, K.R. Delaney, C.J. Kennedy // *Aquat. Toxicol.* - 2004. - Vol. 69, N 2. - P. 133–148.
14. *Potential role of cholinesterases in the invasive capacity of the freshwater bivalve, Anodonta woodiana (Bivalvia: Unionacea): a comparative study with the indigenous species of the genus, Anodonta sp.* / I. Corsi, A.M. Pastore, A. Lodde [et al.] // *Comp. Biochem. Physiol.* - 2007. - Vol. 145 C, N 3. - P. 413–419.
15. *The toxicity of copper to crucian carp (Carassius carassius) in soft water* / J. Schjolden, J. Sorensen, G.E. Nilsson [et al.] // *Sci. Total Environ.* - 2007. - Vol. 384, N 1-3. - P. 239 – 251.

Г.І. Фальфушинська¹, Л.Л. Гнатюшина¹, В.В. Дяков¹, О.О. Шулдык¹, Й.К. Нам², О.Б. Столяр¹

¹Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка, Украина

²Национальный университет Пукионга, Бусан, Республика Корея

СОСТОЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ ДЕТОКСИКАЦИИ КАРАСЯ CARASSIUS AURATUS РАЗНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ТИОКАРБАМАТНОГО ФУНГИЦИДА

Сравнена адаптивная способность карасей из двух местностей, условно чистой (З) и загрязненной (Б), к действию Zn, Mn-тиокарбаматного фунгицида (коммерческий препарат ТАТТУ, 9,1 мкг/дм³ и 91 мкг/дм³) на протяжении 14 суток. У контрольных рыб Б-группы выявлены признаки нейротоксичности, активации ферментов биотрансформации и высшее содержание кадмия в тканях сравнительно из З-группой. ТАТТУ угнетал холинэстеразную активность у животных З-группы и активировал холинэстеразу и глутатионзависимую биотрансформацию ксенобиотика у животных Б-группы, особенно в жабрах. В обеих группах уменьшается содержание эссенциальных металлов цинка, меди и марганца в тканях. Показатели жабр свидетельствуют о более успешной адаптации рыб Б-группы к действию ТАТТУ.

Ключевые слова: тиокарбаматный фунгицид, карась, нейротоксичность, биотрансформация, медь, цинк, марганец, кадмий

H.I. Falfushynska¹, L.L. Gnatyshyna¹, V.V. Dyakov¹, O.O. Shuldyk¹, Y.K. Nam², O.B. Stolyar¹

¹ Ternopil National Volodymir Hnatiuk Pedagogical University, Ukraine

²National university of Pukiyonga, Busan, Republic of Korea

STATUS OF MOLECULAR SYSTEM OF DETOXIFICATION OF CARASSIUS AURATUS FROM DIFFERENT POPULATIONS UNDER EFFECT OF THIOCARBAMATE FUNGICIDE

The aim of this study was a comparison of adaptive ability of crucian carp from two sites, relatively clean (Z) and polluted (B), under exposure of Zn,Mn-thiocarbamate fungicide (commercial product TATTU, 9.1 and 91 mg⁻¹·L⁻¹) during 14 days. In control fish of B-group the signs of neurotoxicity, activation of biotransformation enzymes and higher content of cadmium were revealed in the tissues compared with the Z-group. Following exposure to the TATTU demonstrated an oppression of cholinesterase activity in animals of Z-group and activation of cholinesterase and glutathione-dependent biotransformation of

xenobiotics in animals of B-group, especially in the gills. In both groups the levels of essential metals zinc, copper and manganese in the tissues have been decreased. The gills parameters indicated more successful adaptation of fish from B-group to TATTU.

Key words: thiocarbamate fungicide, crucian carp, neurotoxicity, biotransformation, copper, zinc, manganese, cadmium

УДК 569.554.4 : 639.321.97

О.В. ФЕДОНЕНКО, Н.Б. ЄСІПОВА, Т.С. ШАРАМОК, В.О. ЯКОВЕНКО,
Т.В. АНАНЬЄВА

Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара
пр-т Гагаріна, 72, Дніпропетровськ 49010, Україна

ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ СУЧАСНОГО СТАНУ ПРОМИСЛОВОГО ІХТІОКОМПЛЕКСУ ЗАПОРІЗЬКОГО (ДНІПРОВСЬКОГО) ВОДОСХОВИЩА

Майже усі домінуючі види промислового іхтіокомплексу Запорізького водосховища мали високі коефіцієнти накопичення важких металів, а за вмістом нікелю у 2–2,5 рази перевищували санітарні ГДК. Найбільш пристосованим до напружених гідроекологічних умов виявився карась сріблястий, у депресивному стані – популяції плітки та ляца.

Ключові слова: водосховище, промислові види риб, морфо-фізіологічні та репродуктивні показники, важкі метали

Запорізьке (Дніпровське) водосховище створено у 1932 р. унаслідок утворення Дніпрогес і пройшло у своєму розвитку декілька етапів. Головні зміни відбувалися у перші роки існування водосховища та при перетворенні його у внутрішньокаскадне. Трансформації гідробіоценозів були пов'язані з уповільненням течії, мулонакопиченням, переформуванням літоралі та вимиванням біогенів з новозалитих ґрунтів. Сучасний етап існування водосховища характеризується посиленням антропогенним тиском. У воді водосховища та його приток постійно спостерігається порушення вимог СанПіН-88 за вмістом Cd, Mn, Cu і на деяких ділянках – за вмістом Zn, Ni та Fe. Зазначені важкі метали здатні активно накопичуватися гідробіонтами, особливо рибами, які утворюють останні ланки трофічних ланцюгів.

Метою роботи є вивчення біологічних та репродуктивних особливостей популяцій основних видів промислової іхтіофауни в умовах антропогенного навантаження на екосистему Запорізького водосховища.

Матеріал і методи досліджень

Комплексні дослідження здійснювалися у весняно-літній період протягом 2004–2009 років. Проби води для токсикологічного аналізу відбирали з різних за антропогенним навантаженням ділянок Запорізького водосховища і обробляли загальноприйнятими методами [6].

Іхтіологічними об'єктами досліджень були види, які складають ядро сучасного промислового іхтіокомплексу Запорізького водосховища: плітка *Rutilus rutilus (L.)*, карась сріблястий *Carassius auratus gibelio*, ляц *Abramis brama (L.)*, судак *Sander lucioperca L.* Збір та обробку іхтіологічних проб здійснювали загальноприйнятими методами [3-5]. Фізіологічний стан риб оцінювали за масою внутрішніх органів: печінки (гепатосоматичний індекс), селезінки, гонад; коефіцієнтом вгодованості. При проведенні паразитологічних досліджень використовували метод повного паразитологічного розтину [1].

Важкі метали у тушках риб визначали методом атомно-абсорбційної спектроскопії після їх сушого зоління [2]. Статистичне опрацювання здійснювали з використанням програмного пакету для персональних комп'ютерів Microsoft Excel.

Результати досліджень та їх обговорення

За специфічними показниками якість води більшості акваторії Запорізького водосховища відноситься до III-го класу 5 категорії і визначається як задовільна (помірно брудна). Якість води