

МОН УКРАЇНИ
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА
(УНУС)

Факультет плодовоовочівництва, екології та захисту рослин
Кафедра біології

Допущено до захисту
„_____” _____ 2024 р.

Зав. кафедри к. с.-г. н., доцент

_____Лариса РОЗБОРСЬКА

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
ступеня вищої освіти магістр

ВИКОРИСТАННЯ ГЕМАТОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ РИБ ДЛЯ ОЦІНКИ
ЗАБРУДНЕННЯ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА ЙОНАМИ ВАЖКИХ
МЕТАЛІВ ТА НАФТОЮ

Виконав: студент II курсу, групи 21 м-б
Освітньої програми Агробіологія
Спеціальності 091 Біологія
ШЕВЧУК Дмитро Іванович

Керівник: Жиляк І.Д., канд. хім. наук, доцент

Умань – 2024

ЗМІСТ

Вступ	3
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	5
1.1.Забруднення водних екосистем металами та нафтопродуктами	5
1.1.1.Антропогенне забруднення водного середовища металами	5
1.1.2.Забруднення водойм нафтопродуктами	7
1.2. Кров риб, її склад та властивості	10
1.3. Дія органічних забруднювачів на склад та структуру крові гідробіонтів	17
1.4. Метали як токсиканти; механізми їх впливу на молекулярному, клітинному та організменному рівнях	20
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ, УМОВИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	25
2.1. Коротка характеристика об'єктів та методів досліджень	25
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	28
3.1. Гематологічні показники риб за дії підвищених концентрацій йонів феруму (III) та купруму (II)	28
3.1.1. Вплив йонів Fe^{3+} та Cu^{2+} на вміст еритроцитів у крові коропа	28
3.1.2. Гематокрит крові коропа за дії йонів металів	30
3.2. Вміст гемоглобіну у крові коропа за інтоксикації йонами феруму (III) та купруму (II)	30
3.2.1. Дія йонів Fe^{3+} та Cu^{2+} на вміст білка у плазмі крові риб	32
3.3. Вплив сублетальних концентрацій нафти на показники крові в коропа	33
3.3.1. Вміст еритроцитів в крові коропа за дії нафти	33
3.3.2. Гематокрит крові коропа за дії сирої нафти	35
3.3.3. Вміст гемоглобіну крові коропа за дії нафти	36
3.3.4. Дія нафтових вуглеводнів на рівень білка в плазмі крові риб	38
ВИСНОВКИ	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	42
ДОДАТКИ	46

ВСТУП

Актуальність теми. В останні роки особливої актуальності набуває проблема охорони водних екосистем від забруднюючих речовин антропогенного походження. Бурхливий розвиток переробної промисловості, хімізація сільського господарства призводить до все наростаючого забруднення навколишнього середовища важкими металами, нафтою і нафтопродуктами, що згубно впливає на всю живу природу [1,2,3].

Метали та нафтопродукти займають домінуюче положення щодо забруднення гідроекосистем України. Потрапляючи в організм гідробіонів вищевказані токсиканти порушують проникливість біологічних мембран, викликають порушення ліпідного обміну, синтез білків; відбуваються зміни активностей ферментів. Це може призводити до ослаблення організму, захворювання окремих особин [4].

Багато пошкоджуючих чинників навколишнього середовища при дії в малих, сумісних з життям дозах, викликають в організмі порушення, які можуть в тій чи іншій мірі компенсуватися за рахунок відновлювальних, захисних адаптивних реакцій. Вловлювати такі «сигнали тривоги» допомагає аналіз реакцій тканинних систем, насамперед гематологічної та імунної, а також змін у метаболічних процесах.

Риби надзвичайно чутливі до різних забруднюючих речовин, що розчинені у воді, тому часто використовуються в моніторингових дослідженнях та при оцінці якості води методами біотестування [5].

Актуальність питання про використання гематологічних параметрів риб як показників антропогенного впливу була відзначена багатьма авторами [6,7]. Система крові тонко відображає реакцію організму на дію різноманітних фізіологічних та патологічних факторів на організм. Адже дія токсикантів призводить в першу чергу до зміни якісних та кількісних показників крові [14]8.

Виявити токсичність тієї чи іншої речовини для риб та інших гідробіонтів і її ступінь можна тільки в експериментальних умовах, так як саме детальне вивчення

водойми не може дати відповіді на ці питання. Також, тільки в експериментальних умовах, можна встановити і нешкідливу концентрацію тієї чи іншої речовини для конкретного виду риб. Звідси стає очевидним необхідність і актуальність розвитку досліджень з іхтіотоксикології.

Мета та завдання досліджень. Проаналізувати можливість використання гематологічних показників коропа лускатого для оцінки забруднення водного середовища йонами феруму (III), купруму (II) та сировою нафтою.

Об'єкт дослідження – функціонування адаптивних систем гідробіонтів.

Предмет дослідження – гематологічні показники коропа лускатого.

Методи дослідження - загальноприйняті методи відбору досліджуваних тканин, морфометричні, центрифугування, мікроскопія, спектрофотометрія, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. У результаті дослідження вперше отримано дані щодо оцінки забруднення води металами та сировою нафтою за допомогою гематологічних показників риб (*Cyprinus carpio* L.). Отримані результати можуть бути використані в біомоніторингу рівня токсичності водного середовища та оцінки якості рибної продукції.

Особистий внесок здобувача полягає у виконанні досліджень, аналізі експериментального матеріалу, статистичній обробці даних, опрацюванні наукової літератури.

Апробація результатів досліджень. Основні результати кваліфікаційної роботи доповідались і обговорювались на засіданнях гуртка кафедри біології та наукових студентських конференціях (додаток А.).

Структура та обсяг. Загальний обсяг дипломної роботи складає 45 сторінок комп'ютерного тексту. Містить всі необхідні розділи, налічує 1 додаток, включає 8 рисунків. Список використаної літератури нараховує 49 джерел.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Забруднення водних екосистем металами та нафтопродуктами

Підвищення концентрацій металів та нафтопродуктів у водному середовищі вище допустимих призводить до надмірного акумулювання їх водними організмами, обумовлює порушення нормального функціонування метаболічних систем у гідробіонтів. Ускладнюється оцінка впливу даних токсикантів на гідроекосистеми ще й тому, що часто спостерігається одночасне перевищення їх граничнодопустимих концентрацій у воді [1].

1.1.1. Антропогенне забруднення водного середовища металами. Серед джерел надходження ВМ в навколишнє середовище антропогенні займають домінуюче положення, набагато випереджаючи в цьому аспекті природні. Із техногенних джерел ВМ надходять в навколишнє середовище у вигляді різноманітних хімічних сполук. Серед сполук неорганічної природи в найбільших кількостях зустрічаються карбонати, галогеніди, оксиди, сульфати і сульфіді [3]. Навантаження на різні компоненти екосистем розподіляється нерівномірно. Частина техногенних викидів, що потрапляють в навколишнє середовище у вигляді найтонших аерозолів, переноситься на значні відстані, викликаючи глобальне забруднення біосфери. Друга частина разом з гідрохімічним стоком потрапляє в безстічні водойми, де накопичується і у водах, і у донних відкладах. Основна ж маса ВМ акумулюється ґрунтом поблизу промислових підприємств, викликаючи локальне забруднення території. Концентрації ВМ в зонах локального промислового забруднення можуть в сотні і тисячі раз перевищувати фонові рівні.

Mn. В поверхневі води манган надходить в результаті вилужнювання залізомарганцевих руд та інших мінералів, що містять манган(піролюзит, псиломелан, брауніт, манганит, чорна охра). Значні кількості мангану надходять в процесі розкладу водних тварин і рослинних організмів, особливо синьо-зелених, діатомових водорослей і вищих водних рослин. Сполуки мангану виносяться в водойми зі стічними водами марганцевих збагачувальних фабрик, металургійних заводів, підприємств хімічної промисловості та з шахтними водами.

Зменшення концентрації іонів мангану в природних водах проходить в результаті окислення $Mn(II)$ до MnO_2 та інших високовалентних оксидів, що випадають в осад. Основні параметри, що визначають реакцію окислення – концентрація розчинного кисню, величина рН і температура. Концентрація розчинних сполук мангану зменшується внаслідок утилізації їх водоростями [9].

Zn. Цинк потрапляє в природні води в результаті процесів руйнування і розчинення горних порід та мінералів (сфалерит, цинкіт, госларит, смітсоніт, каламін), а також зі стічними водами рудозбагачувальних фабрик и гальванічних цехів, виробництв пергаментного паперу, мінеральних красок, віскозного волокна та ін. В воді цинк існує в основному в іонній формі або в формі його мінеральних чи органічних комплексів, іноді зустрічається в нерозчинних формах: у вигляді гідроксиду, карбонату, сульфіду та ін. [10].

Cu. Одними із найбільш лімітуючих токсикантів ВМ, які володіють значною біологічною дією є купрум, кадмій і свинець [11]. Основними джерелами надходження сполук купруму в природні води вважають стічні води хімічних і металургійних виробництв, шахтні води, різноманітні альгіцидні реагенти, що містять купрум, а також сільськогосподарські стоки.

Pb. В останні роки в умовах інтенсивного застосування цього металу в промисловості і в сільському господарстві, особливо небезпечним джерелом його надходження стають стічні води металургійних, металообробних, хімічних виробництв. Одним із серйозних джерел забруднення поверхневих вод сполуками свинцю є спалювання вугілля, застосування тетраетил свинцю як антидетонатора в моторному паливі, а також викиди у водойми із стічними водами рудозбагачувальних фабрик, металургійних підприємств, хімічних виробництв і шахт [10].

Cd. Значні кількості кадмію вносяться в поверхневі води у результаті господарської діяльності. Щорічні викиди кадмію в воду становлять 0,01 – 0,1 мкг в 1л. В ґрунт він потрапляє з пилом і осадами в районі металургійних підприємств, великі його кількості містяться у відходах гальванічних і лакофарбових підприємств, він попадає на сільськогосподарські землі з добривами у вигляді

стічних вод, з фосфорними добривами і гербіцидами [12].

Со. Сполуки кобальту, як і інших ВМ попадають в поверхневі води в результаті процесів вилуговування мідноколчеданних руд, екзогенних мінералів і порід, із ґрунтів при розкладанні організмів і рослин. Однак, в останні роки в умовах інтенсивного застосування цих металів в промисловості і сільському господарстві особливо небезпечним джерелом їх надходження стають стічні води металургійних, металообробних, хімічних виробництв [13].

1.1.2. Забруднення водою нафтопродуктами. Викиди нафти у воду швидко вкривають великі площі при цьому товщина забруднення також буває різною. Холодна погода та вода вповільнюють розтікання нафти по поверхні, тому дана кількість нафти вкриває більші ділянки влітку, ніж взимку. Товщина розлитої нафти більша в тих місцях, де вона збирається вздовж берегової лінії. Рух нафтового розливу залежить від вітру, течії та припливів. Деякі види нафти опускаються (тонуть) і рухаються під товщею води або вздовж поверхні в залежності від течії та припливів [14].

Сира нафта та продукти переробки починають змінювати склад в залежності від температури повітря, води та світла. Компоненти з низькою молекулярною вагою легко випаровуються. Кількість випарів коливається від 10 % при розливах важких типів нафти і нафтопродуктів (№ 6 паливний мазут) до 75 % - при розливах легких типів нафти і нафтопродуктів (№ 2 паливний мазут, бензин). Деякі компоненти з низькою молекулярною вагою можуть розчинятися у воді. Менше 5 % сирої нафти і нафтопродуктів розчиняються у воді. Цей „атмосферний” процес сприяє тому, що залишена нафта стає більш щільною і нездатною плисти по поверхні води [15].

Нафта під впливом сонячних променів окиснюється. Тонка плівка нафти і нафтової емульсії легше окислюється у воді, ніж товстий шар нафти. Нафта з високим вмістом металу або низьким вмістом сірки окислюється швидше, ніж нафта з низьким вмістом металу або високим вмістом сірки. Коливання води і течія змішують нафту з водою в результаті чого утворюється або нафто-водяна емульсія (суміш із нафти та води), яка з часом розчиниться, або водо-нафтова емульсія, яка

не буде розчинятися. Водно-нафтова емульсія містить від 10 % до 80 % води; 50-80 відсоткові емульсії часто називають «шоколадним мусом» через густий, в'язкий вигляд та шоколадний колір. «Мус» поширюється дуже повільно і може залишатися на воді або березі без зміни протягом багатьох місяців [14].

Лабораторне моделювання випаровування нафти показало [16], що в перші хвилини попадання у воду більша частина нафти (залежно від внесеної кількості – від 52 до 62 %) розподіляється у вигляді плівки на поверхні води. Протягом перших днів відбувається основний перерозподіл її фракційного складу у водній фазі, переважно за рахунок зниження на 50 – 60 % частки плівкової нафти та збільшення сорбованих на твердих частинках форм, незалежно від концентрації. Це свідчить про початок самоочищення.

Відомо, що сорбуються головним чином нерозчинні чи слаботорозчинні у воді фракції, які менше піддаються процесові деструкції. Період напіврозпаду сорбованих важких фракцій вираховується місяцями, а іноді роками, залежно від хімічного складу та фізико-хімічних властивостей вихідної нафти.

Інший процес самоочищення водного середовища від нафти – випаровування – також найбільш інтенсивно відбувається протягом перших діб. За перші 5 годин випаровується 1,5 – 2 % нафти, незалежно від вихідної кількості, до кінця перших діб – 10 – 15 %. За другу добу зміни цієї складової незначні [14].

Час знаходження нафти у воді зазвичай складає менше 6 місяців, якщо розлив нафти не відбувся напередодні або безпосередньо взимку в північних широтах. Нафта може потрапити в льодову пастку до настання весни, коли почне піддаватись дії повітря, вітру, сонячних променів і посиленій дії мікробів, супроводжуваних підвищенням температури води. Період зберігання нафти в прибережному навколишньому середовищі варіюється від декількох днів на скелях до більш ніж 10 років в захищених від припливо-відпливів та сирих ділянках.

Відомо, що основні характеристики нафти, в тому числі її токсичність, в значній мірі залежать від вихідної концентрації, температури та інших факторів, а також від процесу перерозподілу фракцій за рахунок випаровування, розчинення, хіміко-біологічного окиснення, емульгування, сорбування. Основним результатом

перерозподілу фракцій є зміна співвідношення між водорозчинними і нерозчинними складовими нафти. Нерозчинна складова визначається процесами, що домінують при довготривалій експозиції.

Отримані дані свідчать про те, що можливість розчинення (чи насичення води розчинними формами) нафтопродуктів не залежить від кількості внесеної нафти, а визначається лише факторами розчинності. Також результати свідчать про незалежність характеру фракціонування від вихідної концентрації. При цьому спостерігається перерозподіл фракційного складу нафти у воді з часом в бік збільшення вмісту важких фракцій. Аналіз результатів досліджень Мак Олифа про фізико-хімічні і структурні особливості речовин дозволив розмістити вуглеводі в зростаючій за ступенем розчинності у воді ряд: парафіни – циклопарафіни – алкени – кумулени – ацетилени – циклооліфени – ароматичні [17].

Відмічені наступні структурні особливості сирої нафти та продуктів її переробки - дизельного пального, бензинів.

Дизельне пальне – пальне не летке, складається з малорозчинних у воді фракцій, що закипають в інтервалі між температурами кипіння керосину та важких мастильних масел. При отриманні бензинів відбувається трансформація великих молекул керосинової фракції до ароматичних циклічних вуглеводнів. При цьому в бензинах з великим октановим числом міститься більше вуглеводнів з розгалуженою ланкою, олефінів з подвійним зв'язком в середині молекули. При їх отриманні відбувається більш глибока циклізація та ароматизація. Відмінності в структурі цих ксенобіотиків обумовлюють відмінності в фізико-хімічних властивостях. Відповідно в дизельному паливі вміст розчинних фракцій незначний, у нафті він вищий, в бензині А-95 – максимальний.

Небезпека нафтового забруднення збільшується одночасною наявністю у водному середовищі важких металів, пестицидів, оскільки в більшості випадків при різних поєднаннях з цими ксенобіотиками спостерігається синергічний ефект [18].

Озера і закриті водойми відрізняються процентним вмістом солі від прісних (менше 0,5 мільйонної долі) до сильно солоних (40 мільйонних долей). Озера сильно відрізняються за розмірами, конфігурацією і характеристиками води, тому

вплив розливої нафти і біологічні наслідки важко попередити. Мало відомо про вплив і наслідки розливів нафти на екосистеми прісних вод [17].

Найбільше страждають від розливів нафти на озерах та річках птахи, такі як: качки, гуси, лебеді, гагари, чомги, лисухи, баклани, пелікани та ін.

Рептилії та земноводні стають жертвами розливів нафти у мілких водах. Яйця земноводних, відкладені поруч до водної поверхні мілких вод, також негативно сприймають дію забруднення.

Дорослі риби гинуть у мілких водах струмків, куди потрапляє нафта [19]. Види, що населяють мілководдя біля бережів озер та рік, також несуть втрати. Смертність риби в ріках важко визначити, оскільки риба, що загинула та пошкоджена виноситься течією. Фітопланктон, зоопланктон, ікра чи личинки в безпосередній близькості з водною поверхнею також підпадають під вплив нафти. Водні комахи, молюски, ракоподібні та інші представники флори та фауни можуть піддаватися серйозному впливу нафти в мілководдях озер та рік. Багато прісноводних, що гинуть, виноситься течією.

1.2. Кров риб, її склад та властивості

Кров - це різновид сполучної тканини, яка заповнює кровоносні судини і безпосередньо не контактує з клітинами організму.

Як тканина внутрішнього середовища організму кров має такі особливості: складові частини утворюються за її межами; міжклітинною речовиною тканини є рідина; здійснює гуморальний зв'язок в організмі.

Кров виконує такі функції:

1. Дихальна функція – одна з найважливіших. Полягає в переносі кисню від органів дихання до тканин організму та вуглекислого газу CO_2 від клітин до органів дихання.

2. Трофічна (живильна) функція. Кров забезпечує усі клітини організму поживними речовинами, які виконують пластичну і енергетичну функції (амінокислотами, глюкозою, водою, мінеральними речовинами та вітамінами).

3. Екскреторна функція полягає у видаленні з клітин та тканин організму

кінцевих продуктів їхнього обміну.

4. Теплорегуляційна - збереження сталості температури тіла. Кров вирівнює температуру в різних тканинах, органах і в організмі в цілому. Ця функція здійснюється за рахунок фізичних властивостей води плазми крові.

5. Регуляторна – проявляється в тому, що кров'ю в тканинах і органах підтримується сталість внутрішнього середовища, осмотичного тиску, певний рівень води.

6. Захисна функція забезпечується вмістом в крові імуноглобулінів та антитіл, які захищають організм від багатьох інфекцій. В крові знаходяться білки, за участю яких відбувається зсідання крові з утворенням її згустку, який закупорює просвіт судин при пораненнях і зупиняє кровотечі [20].

Кров представляє собою рідину, середні показники вмісту якої для риб становлять від 0,5 до 4 % від загальної маси тіла [21]. Вона містить рідку частину – плазму крові (близько 55 - 60 % об'єму) і формені елементи (клітини крові: еритроцити, лейкоцити, тромбоцити) (близько 40 - 45 % об'єму).

Плазма крові – це жовтувата рідина, яка вміщує:

1. H_2O – приблизно 91 %.

2. Білки – 8 % (альбуміни, глобуліни, фібриноген). Вони утримують воду в плазмі (при голодуванні зменшується кількість білків, вода переходить з крові до тканин, утворюючи набряки); глобуліни можуть перетворюватись на антитіла, які знешкоджують мікроби; фібриноген – бере участь у зсіданні крові; білки також переносять поживні речовини, продукти розпаду білків та нуклеїнові кислоти, гормони, мікроелементи, вітаміни.

3. Жири – 0,8 %.

4. Глюкоза – 0,12 %. При зниженні – підвищується збудження клітин головного мозку (судоми), порушується кровообіг, дихання, настає смерть.

5. В плазмі риб концентрація загальних ліпідів варіює від 2,99 до 8,42 мг/мл.

6. Сечовина та сечова кислота – 0,05 %.

7. Мінеральні солі – 0,9 %. З них найбільше припадає на долю NaCl, солі Ca, K, Mg. Ця концентрація підтримується на сталому рівні.

8. Амінокислоти, гормони та вітаміни тощо.

Водний розчин солей, концентрація якого дорівнює 0,9 % називають фізіологічним розчином (ізотонічним). Його використовують в клінічній практиці при значних крововтратах або при обезводненні організму.

В крові є близько 20 важливих мікроелементів. Багато з них (залізо, нікель, кобальт) беруть участь у кровотворенні. Зміна складу плазми крові згубно діє на організм [22].

Основну масу формених елементів крові складають еритроцити. Вони є носіями групових властивостей крові [23].

Еритроцити – це червоні кров'яні тільця, дрібні, клітини округленої форми, яким для риб властиве ядро і форма двоввігнутих дисків, що збільшує їх поверхню для контакту з киснем.

Середня тривалість життя еритроцитів – 4 місяці. Утворюються червоні кров'яні тільця в червоному кістковому мозку, руйнуються в печінці та селезінці (2,5 млн за 1 сек). Продукти розпаду старих еритроцитів стимулюють утворення нових. Процес руйнування еритроцитів називається гемолізом.

Еритроцит зовні вкритий мембраною (вміст загальних ліпідів у мембранах еритроцитів риб характеризується видовою специфічністю і варіює в діапазоні 1,33 - 3,61 мг/мл), а всередині майже повністю заповнений білковою речовиною – гемоглобіном (Hb). В нормі концентрація гемоглобіну в крові осетрових риб рівна 12,0 - 13,0 % [22].

Нормальний вміст гемоглобіну в крові райдужної форелі вважається 9,6 - 10,0 г % [24]. Саме завдяки гемоглобіну еритроцити переносять кисень.

Молекула гемоглобіну складається з двох частин: білка – глобіну і небілкової частини – гема. Глобін становить 96 % маси молекули. У молекулі гемоглобіну міститься одна молекула глобіну і чотири молекули гема. До складу гема входить атом заліза, здатний приєднувати і віддавати молекулу кисню. При цьому валентність заліза не змінюється, тобто воно залишається двовалентним. Така властивість заліза визначається будовою його атома, який має велику кількість вільних електронів, що дозволяють утворити комплексні сполуки, які беруть участь

в окисно-відновних реакціях. Кожен атом заліза приєднує молекулу кисню і утворює оксигемоглобін, який нестійкий, легко віддає кисень і знову перетворюється на гемоглобін. Приєднання кисню до гемоглобіну відбувається внаслідок послідовних фізико-хімічних перетворень. Приєднання першої молекули кисню до одного з чотирьох гемів викликає конформаційні зміни поліпептидних ланцюгів, які послідовно передаються на інші ланцюги. Внаслідок цього розміри молекул гемоглобіну зменшуються, а при дисоціації оксигемоглобіну знову збільшуються. Ці конформативні зміни лежать в основі підвищення спорідненості гемоглобіну до кисню. У капілярах тканин гемоглобін легко утворює нестійку сполуку з CO_2 - карбгемоглобін, яка у капілярах органів дихання розпадається.

Гемоглобін здатний приєднувати чадний газ CO , що виділяється при неповному згорянні палива, і утворювати з ним стійку сполуку – карбоксигемоглобін ($\text{Hb} + \text{CO} \rightarrow \text{HbCO}$). У цій сполуці він втрачає здатність приєднувати і переносити кисень O_2 . У результаті настає важке отруєння організму. Нестачу кисню в крові називають гіпоксемією, а в тканинах – гіпоксією [20].

Ще однією функцією еритроцитів є захисна – з них виділяється антибіотик еритрин, що бореться з деякими мікроорганізмами [22].

Лейкоцити - білі кров'яні тільця (їх кількість становить 93,5 - 96,3 % [20], більші за еритроцити, мають ядро та здатні до активного амебоїдного руху. Кількість їх у крові може змінюватись: збільшується після їди, живуть 3 - 5 днів до 10 років. Утворюються в червоному кістковому мозку, селезінці, поступово проходячи всі стадії дозрівання. Цей складний процес може порушуватись у разі радіоактивного опромінення або дії різних хімічних чинників.

Лейкоцити за походженням, функцією і будовою поділяють на дві групи: зернисті (гранулоцити) і незернисті (агранулоцити).

Гранулоцити дістали свою назву тому, що в їхній цитоплазмі містяться гранули. В залежності від забарвлення цих зерняток розрізняють: нейтрофільні гранулоцити (приймають нейтральний барвник), еозинофільні гранулоцити (сприймають кислий барвник – еозин) і базофільні гранулоцити (сприймають лужний барвник). Кількість гранулоцитів становить 50 - 70 % усіх лейкоцитів крові.

Нейтрофільні гранулоцити найчисленіші серед гранулоцитів (65 - 75 %). Їх основна функція полягає у захисті організму від мікроорганізмів та їхніх токсинів. Вони фагоцитують бактерії, а також продукти руйнування власних тканин і розчиняють їх лізосомальними ферментами (протеазами, пептидазами, оксидазами, дезоксирибонуклеазами і ліпазами). Крім фагоцитозу, нейтрофільні гранулоцити виробляють захисні білки, гістони, інтерферон, що має противірусну дію.

Еозинофільні гранулоцити становлять 1 - 5 % усіх лейкоцитів. Ці гранулоцити мають велике значення у руйнуванні і знешкодженні токсинів білкового походження і чужорідних білків. Тому значне збільшення кількості цих клітин – еозинофілія, спостерігається при алергічних реакціях, глистних інвазіях та аутоімунних захворюваннях, при яких в організмі виробляються антитіла проти власних клітин.

Базофільні гранулоцити становлять 0,5 - 1 % всіх лейкоцитів крові. Ці клітини містять і виділяють гепарин, який активує ліполіз, а також беруть участь в обміні гістаміну. Гепарин та інші продукти цих клітин запобігають зсіданню крові в осередку запалення, а гістамін розширює капіляри і таким чином сприяє процесам розсмоктування і загоєння.

Агранулоцити поділяють на: лімфоцити та моноцити.

Моноцити становлять 6 - 8 % кількості всіх лейкоцитів крові, утворюються, як і всі лімфоцити, в кістковому мозку, але у кров виходять недозрілими клітинами. Моноцити – найактивніші фагоцити з усіх лейкоцитів, які здатні захоплювати і перетравлювати мікроби і уламки зруйнованих клітин власного тіла.

Лімфоцити серед усіх білих кров'яних клітин мають особливе значення тому, що вони точно відрізняють все «чуже» від «свого» і забезпечують реакції клітинного та гуморального імунітету [22].

Процентне співвідношення між видами лейкоцитів – лейкоцитарна формула, досить стала величина порушується під час різних хвороб має діагностичне значення.

Збільшення кількості лейкоцитів називається лейкоцитозом, а зменшення – лейкопенія.

Лейкоцити не тільки розносяться з током крові, а й можуть самостійно пересуватися за допомогою псевдоніжок. Проходячи крізь стінки капілярів лейкоцити рухаються до скупчення хвороботворних мікробів і за допомогою псевдоніжок захоплюють та перетравлюють їх. Це явище було відкрито Мечніковим у 1908 році і названо фагоцитозом. Також лейкоцити здатні виробляти специфічні білки – антитіла.

В певних випадках (при пересадці органів) фагоцитарна властивість лейкоцитів може бути шкідлива. Лейкоцити реагують на пересажені органи так, як на хвороботворні організми, фагоцитують їх, руйнують. Тому при проведенні таких операцій фагоцитоз пригнічують різними речовинами.

Тромбоцити (бляшки Біццацера) або безбарвні кров'яні пластинки відносяться до формених елементів крові і представляють собою дрібні різної форми плазматичні утворення голубувато-розовато-зернистою протоплазмою. Тромбоцити утворюються в кістковому мозку з гігантських клітин – мегакаріоцитів. Спочатку з гемогістобласта утворюється мегакаріобласт (тромбобласт), а потім промегакаріобласт, який далі перетворюється в мегакаріоцит – велику клітину з розчленованим своєрідної форми ядром і зернистою розоватою протоплазмою, що витягується в довгі жгути від яких відшнуровуються тромбоцити.

В тромбоцитах розрізняють периферичну частину – гіаломерт (від грецького слова “гіалос” – скло) і центральну частину з наявністю невеликої кількості грануломер (від грецького слова “гранулом” – зерно). В наш час рахують, що ці частини тромбоцитів мають велику кількість факторів, які приймають участь в процесі згортання крові і впливають на проникливість і резистентність судинної стінки. Існує думка, що центральна частина тромбоцитів виробляє особливу речовину – ретрактозим, що сприяє стискуванню (рефракції) згустка фібрину, а периферична частина виділяє тромбокіназу та інші фактори, які приймають участь в утворенні активного тромбопластину крові, прискорює процес перетворення протромбіна в тромбін, фібриногена на фібрин і регулює процес фібринолізу. Крім того, тромбоцити володіють агдезивними (прилипальними) і аглютинаційними

(склеювальними) властивостями, утворюють первинний тромб, а наявність в них серотиніну обумовлені звуженням кровоносних судин. Тромбоцити являються переносниками антитіл. Вони за структурою, величиною і якісними властивостями зовсім неоднорідні утворення [20].

Це залежить в основному від степені зрілості і морфологічних властивостей мегакаріоцитів, від яких відшнуровуються кров'яні пластинки. Від зрілих мегакаріоцитів, які мають багату зернистість в протоплазмі, відділяються більш зернисті, але дрібні по величині тромбоцити, а від мегакаріоцитів з малою зернистістю – більш великі тромбоцити від менш зрілих. Якісні зміни тромбоцитів залежать в основному від морфологічних властивостей стану мегакаріоцитів. Морфологічно прийнято розрізняти:

- а) нормальні (зрілі) форми кров'яних пластинок діаметром не більше 2 – 4 мкм із зернистістю в центрі;
- б) молоді (юні) форми із малою зернистістю;
- в) старі форми подразнення з грубою великою піктонічною зернистістю;
- г) дегенеративні (вакуулізовані) форми різної величини і форми.

В нормі тромбоцитарна формула вміщує 92 - 96 % нормальних зрілих форм, 2 - 4 % нормальних молодих форм і 2 - 4 % нормальних старих форм. В патологічних випадках виявляються зміни в співвідношенні між окремими видами форм.

З'являються дегенеративні форми з малою зернистістю або її повною відсутністю, вакуолізацією протоплазми і значною кількістю незрілих форм (з відривками ядерних включень і т.д.) [22].

Морфологічні показники крові напряду пов'язані з рівнем живлення та метаболізмом риб:

- максимальний рівень еритроцитів, гемоглобіну та лейкоцитів у крові риб припадає на літньо-осінній період у придонних видів та на весняно-літній – у донних видів;
- у переднерестовий та нерестовий періоди спостерігається підвищення кількості еритроцитів, гемоглобіну та лейкоцитів;

- у післянеристовий період спостерігається підвищення рівня лейкоцитів та змінюється процентне співвідношення основних груп формених елементів у лейкоцитарному профілі.

І тому морфологічні показники крові є індикаторами фізіологічного стану популяції риб для різних періодів річного циклу[25].

1.3. Дія органічних забруднювачів на склад та структуру крові гідробіонтів

Оскільки у воді відбувається біодеградація і перетворення нафти, то спостерігається поява широкого кола речовин з різноманітними властивостями, які не менш шкідливо впливають на біоту водойм. Саме тому в наш час риб використовують в якості біоіндикаторів забруднення оточуючого середовища поліциклічними вуглеводнями [26].

Є різні точки зору щодо впливу різних фракцій нафти на живі організми. Деякі вітчизняні та зарубіжні науковці стверджують, що ступінь токсичності нафтопродуктів на пряму залежить від їх розчинності у воді.

З одної сторони найбільш високу токсичність для риб мають ті фракції нафти, які містять максимальну кількість розчинних у воді ароматичних вуглеводнів. Ароматичні вуглеводні володіють високою розчинністю та здатністю проникати через клітинні мембрани, в тому числі і через зяброві.

З іншої сторони найбільш високою токсичністю володіє нерозчинна складова частина нафти. Але її токсичність залежить від багатьох факторів, а саме: температури, рівномірного розподілу частинок емульгованої нафти.

Водорозчинна фракція нафтопродуктів містить переважно бі- і поліциклічні вуглеводні. Решта вуглеводнів менш розчинні і знаходяться у воді в завислому стані, що супроводжується швидким розкладанням.

Гідробіонти накопичують великі кількості певних забруднюючих речовин в тканинах, що характеризується низькою швидкістю обміну вуглеводнів. Структурами, що довго утримують забруднення є ліпопротеїди, ліпіди мембран тощо [27].

У конкретному випадку при інтоксикації крові коропа фенолом спостерігаються такі зміни:

- збільшення кількості еритроцитів та гематокриту, що супроводжується зменшенням вмісту в них гемоглобіну. Очевидно, що за дії токсикантів має місце порушення синтезу гемоглобіну. Про це свідчить зменшення за дії фенолу активності мітохондрійної δ -АЛС. В інших випадках стан гемоглобіну визначається співвідношенням його лігандних форм;

- спостерігається зниження рівня оксигемоглобіну, вміст метгемоглобіну в більшості ж випадків змінюється на незначно (3 - 5 %). При цьому між рівнями окси- и дезоксиформ відмічено зворотню залежність. Дані свідчать про індивідуальність дії досліджуваних речовин, однак, спільною є тенденція до підтримання функційно достатнього рівня основних компонентів гемоглобінової системи;

- компенсаторно-адаптивними реакціями на токсичну дію можна вважати збільшення числа еритроцитів, активацію еритропоетичної активності тканин, зростання активності метгемоглобінвідновлюючої НАДН-залежної метгемоглобінредуктази, одного з основних ферментів блокування окислення гемового заліза.

В умовах дії фенолу криві дисоціації оксигемоглобіну зміщені вліво. В випадку зміщення кривих вправо за низької спорідненості дезоксигемоглобіну до кисню в крові збільшується вміст незв'язаного молекулярного кисню (P_{50} зростає), внаслідок чого розвивається його надлишкова оксигенація, що в умовах активації гліколізу може привести до неконтрольованого використання кисню не на окиснення енергетичних субстратів, а на утворення пероксидних похідних ліпідів [28].

З іншого боку, зростання спорідненості гемоглобіну до кисню при дії фенолу, підкислення та залуження води можна розглядати як захисні зміни, спрямовані на підтримання необхідної кількості функціонально активного гемоглобіну, оскільки надлишкова оксигенація, крім ПОЛ, може також сприяти окисненню гемового заліза.

Таким чином, збільшення спорідненості гемоглобіну до кисню може бути фактором підтримання функціонально необхідного рівня вільного кисню та засобом запобігання неконтрольованих перекисних процесів.

Щодо стану вуглеводного та енергетичного обміну в крові коропа при інтоксикаціях, то відбуваються такі процеси:

- активація гліколізу та пригнічення інших процесів. Унаслідок цього в крові накопичується лактат, знижується відношення вільних НАД-пар, а також використання глюкози;
- виявлено зниження рівня всіх аденілатів в крові, що свідчить про пригнічення процесів енергозабезпечення та, ймовірно, розвиток патології в організмі в цілому. При цьому знижується рівень загального та мінерального фосфору;
- цікавий такий факт, що за дії фенолу основна роль в захисті білків належить SH-групам, які зв'язують їх та знижують доступ до функціонально-активних центрів.

На основі аналізу одержаних даних можна запропонувати функціонування декількох механізмів захисту структурно-функціональної цілісності білків крові за дії стрес-факторів.

Отже, за дії екстремальних факторів водного середовища, а саме фенолу порушуються морфо-функціональні характеристики еритроцитів, в них знижується загальний вміст гемоглобіну, змінюється співвідношення його форм з зростанням частки метгемоглобіну при одночасному інгібуванні метгемоглобінредуктазної системи його відновлення.

Виявлено відмінні механізми підтримання гомеостатичного рівня кисню в крові риб в умовах голодування при низьких температурах та за дії токсикантів. При дії природніх абіотичних факторів водного середовища зростання концентрації оксигемоглобіну супроводжується зниженням P_{50} та підвищенням спорідненості гемоглобіну до кисню. При інтоксикаціях фенолом знижується спорідненість гемоглобіну до кисню, зростає значення P_{50} , підтримання рівня киснезабезпечення здійснюється за рахунок збільшення вмісту оксигемоглобіну

[29].

В загальному негативний вплив нафти позначається як на якісному так і на кількісному складі крові:

- змінюється конфігурація еритроцитів;
- відбувається децентралізація та деформація ядер червоних кров'яних клітин;
- спостерігається нерівномірний розподіл гемоглобіну в клітинах еритроцитів;
- збільшується кількість лейкоцитів (лейкоцитоз).

Під впливом нафтових продуктів за рахунок метгемоглобіну, за даними О.Г. Мазманіді, у крові збільшується вміст неактивних пігментів [25].

Розчинні нафтопродукти цілком помітно впливають на вміст глікогену в клітині. Його топографія в органі на зрізі різна: є ділянки з малою кількістю глікогену або з його відсутністю.

Нафтопродукти характеризуються вибірковою дією, яка проявляється в значному зменшенні резерву глікогену в печінці порівняно з іншими тканинами.

Враховуючи властивості нафти та нафтопродуктів (аполярність молекул, легка проникність в клітини, розчинність в ліпідах) та сучасне уявлення про будову біологічних мембран та їх ролі в життєвих процесах, можна стверджувати, що вуглеводні нафти, проникаючи в клітинну мембрану, уражають (розчиняють) ліпіди – один з основних її структурних компонентів. Це призводить до порушення фізико-колоїдного стану та руйнування складних ліпопротеїдних компонентів [30].

1.4. Метали як токсиканти; механізми їх впливу на молекулярному, клітинному та організменному рівнях

Важкі метали являють собою надзвичайну небезпеку як забруднювачі природних вод, оскільки вони в порівняно малих кількостях можуть виявляти токсичну дію на водні організми.

Гідробіонти накопичують ВМ в концентраціях у сотні (Fe), тисячі (Hg, Cu, Cd, Co) і сотні тисяч (Zn, Mn) раз перевищуючи їх вміст у воді. Поряд з прямою

токсичною дією на організм ВМ викликають небезпечні віддалені біологічні наслідки (мутагенні, ембріотоксичні, гонадотоксичні та ін. дії).

Важкі метали накопичуються в різних ланках трофічних ланцюгів. Цьому сприяє здатність гідробіонтів акумулювати метали до концентрацій, в сотні і тисячі разів перебільшуючи їх вміст в оточуючому середовищі. Токсичні наслідки призводять до ураження фізіологічних систем організмів та їх масової загибелі [31].

Окрім того, відмічається порушення первинної продукції і трофічних зв'язків, а також рівноваги між авто- і гетеротрофними організмами, що в кінцевому рахунку приводить до порушення біотичного круговороту і дестабілізації еководних систем.

На молекулярному рівні водні організми акумулюють метали з оточуючого середовища і адаптуються до зміни їх природних концентрацій. Спочатку метали поглинаються тканинами організмів в результаті їх адсорбції поверхнею тіл, дихальними шляхами і внутрішніми органами. За адсорбцією йде дифузія через клітинні мембрани, зв'язування внутрішньоклітинними лігандами [17].

Йони металів здатні утворювати в тканинах міцні зв'язки з різними біологічно активними центрами, переважно з сірковмісними лігандами, джерелом яких можуть бути білки та низькомолекулярні тіоли. Вони інактивують металоферменти, руйнуючи при цьому більшість метаболічних процесів, змінюють проникність мембран, інгібують окисне фосфорилування, синтез білків, нуклеїнових кислот. Сублетальні концентрації кадмія і ртуті та їх сполук викликають паталогічні зміни в м'язах, печінці, кишечнику, зябрах та інших органах [32].

Фізико-хімічні властивості тих чи інших речовин визначають їх біогеохімію (розміщення, міграцію і перетворення) в водних екосистемах і зумовлюють інтенсивність і характер їх накопичення в гідробіонтах та впливу на них.

Участь хімічних елементів в сорбційних процесах залежить як від здатності гідробіонтів до акумуляції, так і від властивостей самого елементу, зумовлених його місцем в періодичній системі елементів. Характерною рисою для елементів групи металів є наростання гідролітичних та адсорбційних властивостей із

зростанням порядкового номеру в таблиці елементів, що посилює їх схильність до гідролізу та накопичення в твердій фазі. Очевидно, ця спільна для металів тенденція виявляється і в біосорбційних процесах, хоча, в останньому випадку, вона не повинна бути так чітко виражена як в фізико-хімічних процесах неорганічної природи [33].

Крім розглянутих вище фізико-хімічних закономірностей потрібно відмітити залежність накопичення мікроелементів від їх фізіологічних функцій в організмі. Перш за все і особливо інтенсивно будуть накопичуватись в організмі ті елементи, які необхідні для його життєдіяльності і беруть участь в фізіолого-біохімічних процесах, в яких виконують біокаталітичні функції як необхідні компоненти біологічно активних сполук. В кінцевому рахунку біологічне накопичення елементу визначається не загальним вмістом його в середовищі, а концентрацією тих його форм, які легко і швидко засвоюються гідробіонтами безпосередньо з води або з їжею. До таких форм належать йони металів, здатні реагувати з білковими та іншими молекулами і швидко включатись в метаболічні процеси організму [11].

Біологічна активність деяких металів значно зростає при переході в метильовану форму, це стосується перш за все ртуті та миш'яку. Дослідження показали значне підвищення інтенсивності накопичення в деяких безхребетних метилртуті порівняно з її неорганічними йонними формами [34]. Іншим прикладом залежності біологічного накопичення мікроелементів від форми їх знаходження служить різниця між кількістю кобальту в формі вітаміну B₁₂ (в сотні раз більша) в порівнянні з його мінеральними формами [22]. Ці приклади свідчать про здатність організмів до селективної акумуляції окремих хімічних елементів, що зумовлюється фізіологічною потребою в них гідробіонтів. Проте, це не виключає можливості значн/ої концентрації металів, які не належать до біологічно необхідних, наприклад, свинець, ртуть, олово, уран та ін. [34].

Крім того, відбувається накопичення фізіологічно необхідних елементів у кількостях, які значно перевищують їх фізіолого-біохімічну потребу. Можливість фізіологічної регуляції оптимального вмісту в організмі риб різних мікроелементів та співвідношень між ними показана в роботах по накопиченню металів [10].

Йони металів відіграють надзвичайно важливу роль в багатьох найрізноманітніших біологічних процесах. Останні іноді ставлять жорсткі вимоги до йонів металу і здійснюються під дією лише строго визначених йонів. При цьому метал повинен відповідати потрібним каталітичним і структурним вимогам. Інші процеси менш специфічні. Для них існує можливість заміни одного металу іншим, хоча активність при цьому може знижуватися.

Перехідні елементи в біологічних процесах виступають, перш за все, як каталізатори окисно-відновних реакцій. Елементи четвертого періоду, в яких заповнені 3d-орбіталі, найчастіше мають максимальне координаційне число – шість. Координаційні числа перехідних елементів п'ятого і шостого періодів більше шести. Чотирикоординаційні комплекси можуть мати або тетраедричну, або плоскочватратну конфігурацію, тоді як шестикоординаційні – октаедричні.

Реакції комплексів перехідних металів включають: а) лігандне заміщення, коли один із координованих лігандів витісняється іншим, що знаходиться в розчині; б) окисно-відновні процеси, коли відбувається зміна ступені окислення йону металу; в) реакції координованих лігандів, на які суттєво впливає присутність йону металу.

Як правило, йони металів в клітині існують у вигляді комплексів з білками. Слід зазначити, що метал і білок виявляють взаємну дію один на одного. Метал впливає на електронний і структурний стан білку, тобто змінює його властивості. Але і білок суттєво впливає на металічний центр.

Інтерес до вивчення біологічної дії важких металів пояснюється їх здатністю визначати спрямованість і швидкість багатьох біохімічних та фізіологічних процесів в організмі, в якому вони найчастіше виконують роль біологічних каталізаторів. Головною особливістю цих мікроелементів є їх сильний, іноді вирішальний вплив на життєво важливі процеси і функції організму при дуже низьких рівнях вмісту в оточуючому середовищі, органах та тканинах організмів [10]. Відсутність біогенних мікроелементів чи їх присутність в кількостях, що перевищують фізіологічно чутливий рівень, як і наявність небіогенних елементів, дезорганізує хід хімічних процесів. Наслідки від такого втручання в живі системи,

як правило, поєднуються із фізіолого-біохімічними аномаліями на молекулярному, клітинному, метаболічному рівнях, що в свою чергу проектується на організм в цілому. Саме тому серед принципів фізіолого-біохімічної біоіндикації стану водних організмів останнім часом особлива увага приділяється принципу рівневого підходу [31]. Цей принцип передбачає вивчення фізіолого-біохімічної реакції організму на таких рівнях: молекулярно-генетичному, мембранному, метаболічному, тканинному та органному. Токсична дія металів і адаптація до неї проявляються у взаємодії токсикантів з біологічно активними молекулами, зміні активності функціонування метаболічних та ферментних систем, у зміні основних фізіологічних функцій, а також в морфо-структурних змінах на цих рівнях.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ, УМОВИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Коротка характеристика об'єктів та методів досліджень

Дослідження проводили у навчально-науковій лабораторії «Біонеорганічної хімії, якості і безпеки об'єктів сільськогосподарського виробництва» кафедри біології УНУС у 2024 році.

Дослідження проведено на коропах *Cyprinus carpio* L. дворічного віку масою 250 - 300 г. Дослідних риб виловлювали траловим методом із ставків ТОВ «Рибсервіс», с. Соколівка Уманського району. Досліди проводили в акваріумах об'ємом 200 л. Для цього використовували відстояну водопровідну воду (Na^+ 15 мг·л⁻¹; K^+ 2 мг·л⁻¹; Cl^- 12 мг·л⁻¹; Ca^{2+} 51 мг·л⁻¹; Mg^{2+} 9 мг·л⁻¹; HCO_3^- 115 мг·л⁻¹; SO_4^{2-} 10 мг·л⁻¹; рН 7,2- 7,6). Вміст кисню в воді акваріумів підтримували на рівні 7,0 – 8,0 мг/л. Перед дослідом риб витримували 3 доби в басейнах об'ємом 2 м³. Риб під час дослідів не годували. Було проведено 2 серії досліджень.

В першій - досліджували вплив на риб йонів Fe^{3+} та Cu^{2+} в концентраціях, що відповідали 2 та 5 рибогосподарським гранично допустимим концентраціям (ГДК) [32]. В другій серії дослідів вивчали вплив на риб сирої нафти в концентраціях 10, 20 та 30 ГДК.

Період аклімації становив 14 діб, що вважається достатнім для формування адаптивних захисних механізмів при дії вищевказаних токсикантів [35].

З метою запобігання хронічного впливу на риб їх власних екзометаболітів воду в акваріумах змінювали щодобово.

Згідно поставлених завдань для дослідження гематологічних показників відбирали венозну кров із серця риб. Голку для взяття крові з метою запобігання коагуляції попередньо обробляли розчином гепарину.

Досліджували кількість еритроцитів, гематокрит, рівень гемоглобіну у крові та вміст білка у плазмі крові риб. Контролем служили величини досліджуваних показників тканин риб, які перебували у воді акваріумів без додавання токсикантів.

Підрахунок еритроцитів проводили в камері Горяєва. Для цього градуйованою піпеткою в хімічну пробірку наливають 4 мл розчину Рінгера для

холоднокровних та додають з допомогою мікропіпетки 20 мкл крові. Покривне скло притирають до камери Горяєва. Вміст пробірки ретельно перемішують і пастерівською піпеткою заповнюють камеру Горяєва. Через 1-2 хвилини починають підрахунок числа еритроцитів під мікроскопом в 5 великих або 80 малих квадратах, розташованих по діагоналі. Для визначення кількості еритроцитів в 1 мкл досить помножити отримане при підрахунку число еритроцитів на 10000.

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. У підготовлені таким чином капіляри набирали кров. Кінець капіляра закупорюють за допомогою замазки і ставлять центрифугувати 10 хв при 2000 об/хв. до отримання постійного об'єму еритроцитів. Відлік об'єму еритроцитів і плазми проводять за допомогою міліметрової лінійки. Відсоткове співвідношення стовпчика еритроцитів до висота всього стовпа крові є гематокритною величиною.

Рівень гемоглобіну досліджували гемоглобінціанідним методом [36]. Для цього 0,02 мл крові доливають мікропіпеткою до 5 мл трансформуючого розчину, суміш перемішують і через 10-15 хв вимірюють оптичну густину розчину ($D_{\text{проби}}$) щодо трансформуючого розчину.

Концентрацію гемоглобіну (г / л) розраховують за формулою:

$$C_{\text{гемоглобін}} = C_{\text{калібр}} (D_{\text{проби}} / D_{\text{калібр}}),$$

де $C_{\text{калібр}}$ - концентрація гемоглобіну в калібрувальному розчині,

$D_{\text{проби}}$ - оптична щільність проби,

$D_{\text{калібр}}$ - оптична щільність калібрувального розчину.

Вміст білка в плазмі крові визначали за Лоурі та співавт. [37]. В основі методу Лоурі (1951) лежить реакція з реактивом Фоліна-Чокалтеу, активним компонентом якого є комплекс «молібдат-вольфрамат-фосфорна кислота ». Забарвлення розчину, що виникає, обумовлюється одночасним протіканням біуретової реакції і процесу відновлення реактиву Фоліна циклічними амінокислотами - тирозином, триптофаном та іншими, що входять до складу білкових молекул. Для цього до 0,01 мл плазми додавали 1 мл води та 4 мл реактиву С, перемішували і залишали на 15

хв. Після цього додавали 0,4 мл реактиву Фоліна та чекали 40 хв для розвитку синього забарвлення. Розчин колориметрували при 750 нм на СФ-26. Оптичним контролем були 1 мл води, 4 мл реактиву С та 0,4 мл Фоліна. Розрахунок кількісного вмісту білка в плазмі крові ведуть за калібрувальною кривою.

Всі одержані експериментальні дані оброблено статистично з використанням пакету “Microsoft Excel”.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Гематологічні показники риб за дії підвищених концентрацій йонів феруму (III) та купруму (II)

Гематологічні показники об'єктивно відображають фізіологічний стан організму. Вони варіюють в порівняно вузьких межах, специфічні для окремих видів і здатні відображати різні фізіологічні процеси і патологічні зміни організму. Гематологічні показники змінюються залежно від температури води, гідрохімічного режиму, складу кормів, сезону року, віку, стресових чинників і можуть виступати як специфічні маркери для оцінки фізіологічного стану організму риби. Вивчення динаміки гематологічних і біохімічних показників крові дозволяє визначити діапазон зміни параметрів усередині одного виду і масштаби фізіологічних перебудов за дії токсикантів різного походження в умовах тієї або іншої екологічної системи [38].

3.1.1. Вплив йонів Fe^{3+} та Cu^{2+} на вміст еритроцитів у крові коропа

При проникненні в організм риб металів, вони можуть суттєво впливати на співвідношення формених елементів крові риб [39]. З одного боку дана властивість обумовлена ослизненням граничних епітеліальних структур [40], що в свою чергу призводить до гіпоксії та порушення газообміну у зябрах риб, а з іншої надходженням надлишкових кількостей йонів металів у організм та порушенням усіх ланок метаболізму риб взагалі та окремих гематологічних показників зокрема. Дія йонів металів також може викликати порушення, пов'язані з зміною конфігурації самих клітин, децентралізацією ядер, появою значної кількості еритроцитів з слабо забарвленою цитоплазмою та деформованими ядрами, тоді як в здорових риб еритроцити з розміщеним в центрі ядром мають овальну чи дещо витягнуту форму та забарвлені рівномірно [41]. Все це призводить до порушення їх основної функції, і з метою забезпечення транспорту кисню до тканин кількість еритроїдних клітин зростає.

Тому ми намагались з'ясувати як підвищені концентрації йонів купруму та

феруму впливають на кількість еритроцитів у крові досліджуваних риб.

Як показали результати дослідження, кількість еритроцитів у досліджуваних риб знаходилася в діапазоні 1,34-1,54 млн. на 1 мм³ (рис. 3.1).

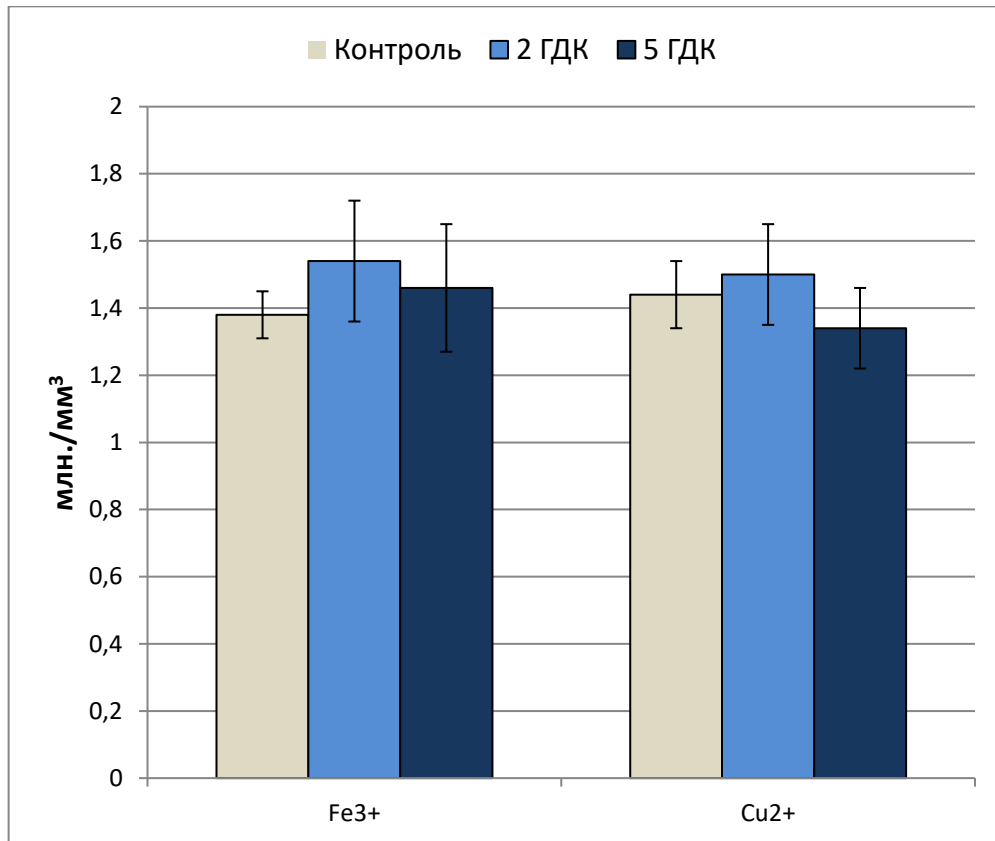


Рис. 3.1. Вміст еритроцитів у крові коропа за дії йонів Fe³⁺ та Cu²⁺, $M \pm m$, $n=5$

Дана величина знаходиться в межах норми для даного виду риб [42]. За дії 2 ГДК йонів металів проходить незначне зростання кількості еритроцитів (рис. 1). Дія 5 ГДК йонів Cu²⁺ призводила до зменшення кількості червоних кров'яних тілець. Проте зміни не були статистично достовірними порівняно з контролем ($p > 0,05$). Очевидно, це обумовлено порівняно невеликим терміном аклімації, що призводить лише до незначних фізіолого-біохімічних змін у формених елементах крові. Ймовірно, глибокі структурні зміни у крові та кровотворних органах виникають за довший період та при вищих концентрація йонів металів [43].

3.1.2. Гематокрит крові коропа за дії йонів металів

Гематокрит (гематокритна величина, гематокритне число) — відношення об'єму формених елементів крові (еритроцити, лейкоцити, тромбоцити) до об'єму крові.

Підвищене значення гематокриту риб може бути свідченням згущення крові чи стресу. Низьке значення гематокритного числа може бути наслідком анемії, гемолізу чи пошкодженням зябер [41].

Аналіз результатів дослідження показав зростання гематокриту за дії 5 ГДК йонів феруму та купруму (рис. 3.2).

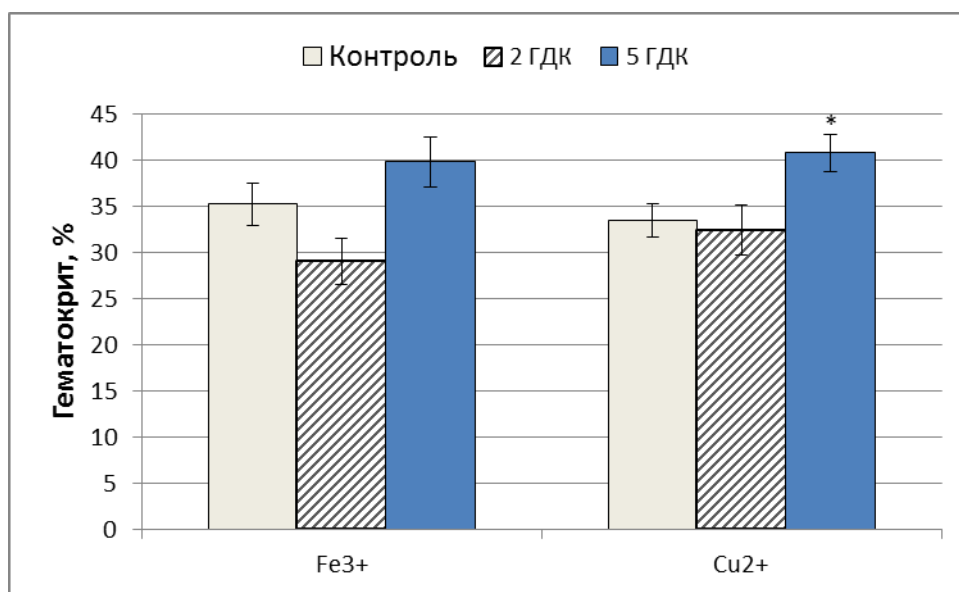


Рис. 3.2. Гематокрит крові риб за дії йонів Fe³⁺ та Cu²⁺, $M \pm m$, $n=5$

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

Це може бути наслідком впливу йонів металів на еритропоез риб [40].

3.2. Вміст гемоглобіну у крові коропа за інтоксикації йонами феруму (III) та купруму (II)

Вміст гемоглобіну у риб може варіювати в доволі широких межах [22]. Максимальний вміст гемоглобіну спостерігається у активних пелагічних видів, а мінімальний — у малорухомих. В той же час за насиченості крові киснем спостерігається зворотна картина. В доних, малорухомих риб цей показник вищий, ніж у пелагічних активних. Цей факт цікавий з точки зору екологічних особливостей, але більше — для пояснення механізму стійкості риб до йонів

металів.

Аналіз отриманих результатів показав достовірне зростання кількості гемоглобіну у крові коропа за дії 5 ГДК йонів феруму ($p < 0,05$; рис. 3.3). З однієї сторони це може обумовлюватися позитивним впливом йонів феруму на вміст пігменту, адже відомо, що ферум (II) входить до складу гемоглобіну [44]. А з іншої – зростання вмісту гемоглобіну може проходити, за рахунок утворення неактивних форм пігменту внаслідок токсичної дії йонів металу [21].

За дії йонів Cu^{2+} динаміка змін дещо відмінна (рис. 3.3). Відмічено достовірне зменшення кількості гемоглобіну за дії 5 ГДК металу. Очевидно, проходить не тільки зниження загального гемоглобіну, а також зміна співвідношення його форм з зростанням частки метгемоглобіну при одночасному інгібуванні метгемоглобінредуктазної системи його відновлення [45].

Дія 2 ГДК йонів обох металів призводила до незначного зростання вмісту гемоглобіну ($p < 0,05$).

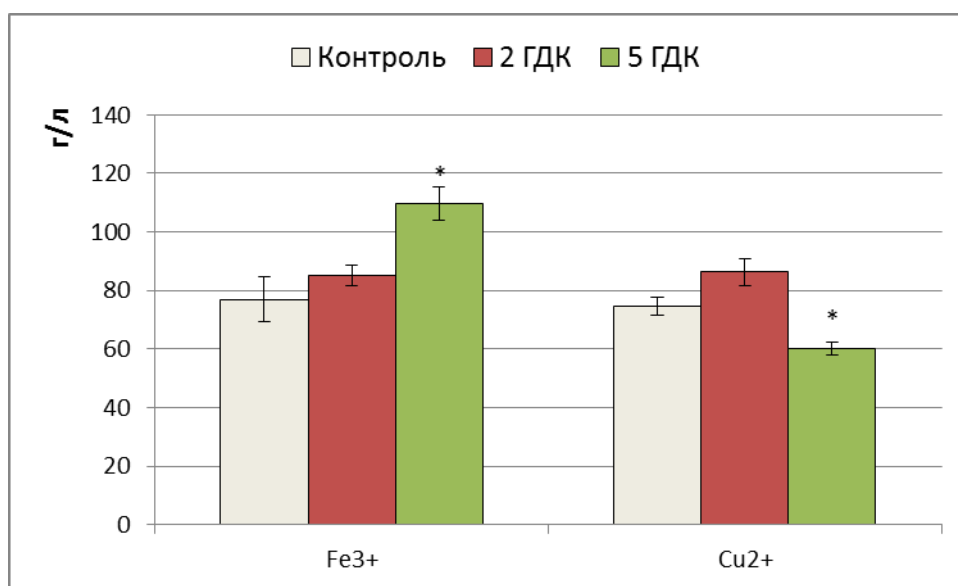


Рис. 3.3. Вміст гемоглобіну в крові коропа за дії йонів Fe^{3+} та Cu^{2+} , $M \pm m$, $n=5$

Можна констатувати більшу токсичність йонів купруму порівняно з йонами феруму. Адже відомо, що при адаптації до полютантів, насамперед відновлюється фізіологічний статус крові – нормалізується вміст гемоглобіну, потім відновлюється нормальна лейкоцитарна формула. найскладніше йде нормалізація структури кровотворних органів [8].

3.2.1. Дія йонів Fe^{3+} та Cu^{2+} на вміст білка у плазмі крові риб

Кров є поліфункціональною системою організму, що динамічно реагує на всі зміни як внутрішнього, так і зовнішнього середовища. Відомо, що зміни вмісту білка плазми, володіючи високою лабільністю, служать індикатором патологічних процесів в організмі [7].

Процес інтоксикації починається з патогенної дії отрут в місцях проникнення (зябрах, шкірі, слизових оболонках), а також рефлекторній реакції з боку нервової системи. Надалі, після попадання в кров отруйні речовини, з'єднуючись з білками, порушують фізико-хімічні процеси в плазмі [6].

Аналіз отриманих даних показав достовірне зростання вмісту білка плазми крові за дії максимальної із досліджуваних концентрацій йонів феруму та обох концентрацій йонів купруму (рис. 3.4). Очевидно підвищені концентрації йонів металів модулюють розпад білків тканин, що в свою чергу сприяє зростанню їх кількості у крові риб. Разом з тим більшення вмісту білка можна пояснювати зростанням кількості альбуміну плазми, як адаптивне пристосування до порушення за дії металів газо- та осморегуляції [46].

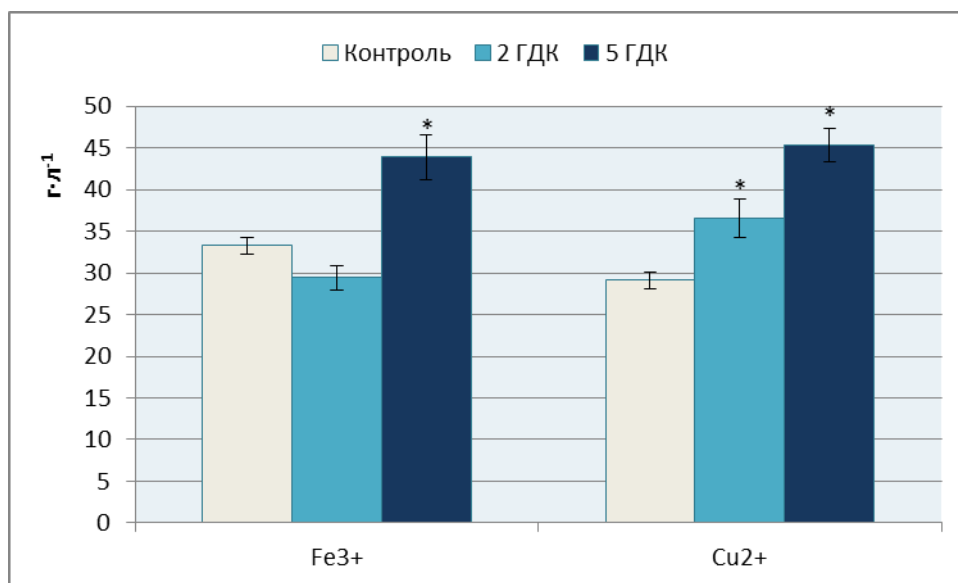


Рис. 3.4. Вміст білка в плазмі крові коропа за дії йонів Fe^{3+} та Cu^{2+} ,
 $M \pm m$, $n=5$

Білки крові можуть виступити ефективними індикаторами для контролю таких складних фізіологічних процесів як осморегуляція, дихання, кровотворення,

травлення специфічний і неспецифічний імунний захист організму, формування різних типів життєвої стратегії [10]

3.3. Вплив сублетальних концентрацій нафти на показники крові в коропа

Дія органічних токсикантів призводить в першу чергу до порушення функціонування пограничних тканин та зміни якісних та кількісних показників крові [5]. Особливої важливості набуває відстежування негативного впливу поллютантів на ранніх стадіях своєї дії, коли ще можливо запобігти інтоксикації. Вибір такої чутливої індикаторної системи як кров, простота і доступність методик робить гематологічні показники щодо вивчення токсичності нафтопродуктів перспективними і актуальними [47].

3.3.1. Вміст еритроцитів в крові коропа за дії нафти

При проникненні в організм риб нафтових вуглеводнів, вони можуть суттєво впливати на співвідношення формених елементів крові риб [14]. З одного боку дана властивість обумовлена зменшенням вмісту кисню у воді внаслідок утворення плівки на її поверхні [17], що в свою чергу призводить до гіпоксії та порушення газообміну у зябрах риб, а з іншої надходженням надлишкових кількостей нафтових вуглеводнів у організм та порушенням усіх ланок метаболізму гідробіонтів взагалі та окремих гематологічних показників зокрема. Тому ми намагались з'ясувати як нафта впливає на кількість еритроцитів у організмі риб.

Як показали результати дослідження, за дії досліджуваних концентрацій сирої нафти проходить зростання кількості еритроцитів (рис. 3.5). Проте достовірними зміни були лише при дії 20 ГДК нафти ($p < 0,05$). Очевидно, це обумовлено з однієї сторони гіпоксією організму риб, так як за дії нафтових вуглеводнів порушується структурна і функціональна роль зябер [15].

А з іншої дія токсиканта викликає порушення, пов'язані з зміною конфігурації самих клітин, децентралізацією ядер, появою значної кількості

еритроцитів з слабо забарвленою цитоплазмою та деформованими ядрами, тоді як в здорових риб еритроцити з розміщеним в центрі ядром мають овальну чи дещо витягнуту форму та забарвлені рівномірно [25]. Все це призводить до порушення їх основної функції, і з метою забезпечення транспорту кисню до тканин кількість еритроїдних клітин зростає.

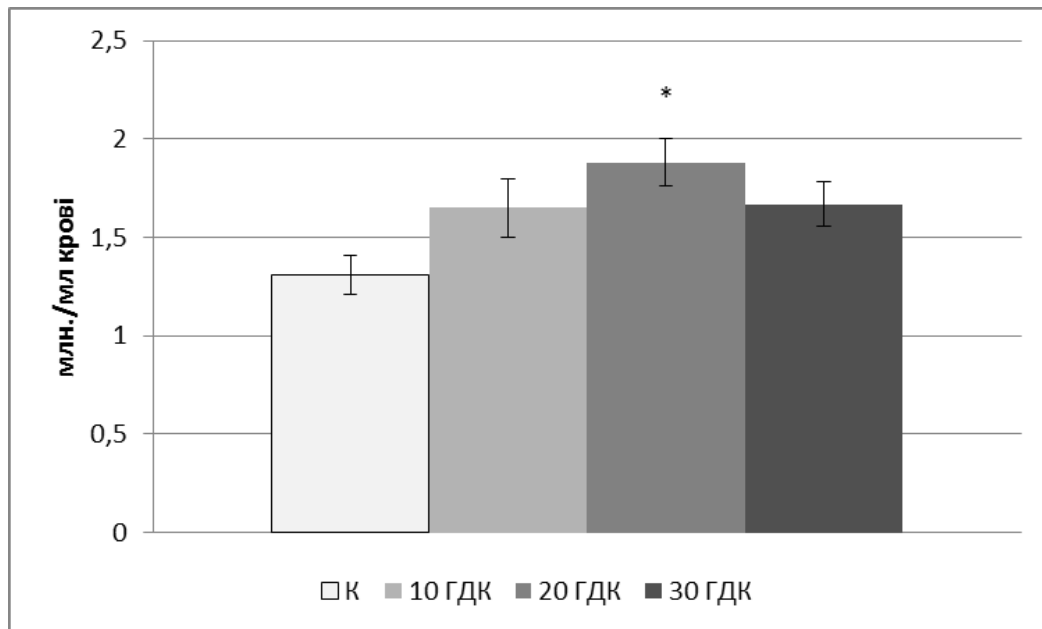


Рис. 3.5. Вміст еритроцитів у крові коропа за дії нафти, $M \pm m$, $n=5$

Це підтверджується дослідями проведеними з судаком [36], де було виявлено, що у відновний період у судака, також як і у інших видів риб, відбувається збільшення інтенсивності еритропоезу, часті випадки мітотичного поділу еритроцитів; поява в периферичному руслі клітин, позбавлених ядра, що слід розглядати як пристосовну реакцію організму, яка забезпечує його виживання в несприятливих умовах; гіпохромазія еритроцитів супроводиться збільшенням їх кількості; з нарощуванням числа повноцінних клітин червоної крові інтенсивність еритропоезу знижується.

Ключову роль в досягненні гомеостазу або постійності внутрішнього середовища грають різноманітні адаптації, що формуються на самих різних рівнях організації живого: від молекулярного до загальноцинотичного. Об'єкт, що в першу чергу зазнає впливу є універсальна система мембран, в зв'язку з її структурними та фізіолого-біохімічними особливостями. Виходячи з властивостей нафти і, перш за все, вуглеводнів (аполярність молекул, легка проникність в

клітини, розчинність в ліпідах), а також з сучасного уявлення про будову біологічних мембран та їх ролі в життєвих процесах, можна стверджувати, що вуглеводні нафти, проникаючи в клітинну мембрану, уражують (розчиняють) ліпіди – один з основних її структурних компонентів [48].

В нашому випадку, очевидно, вже невисокі концентрації нафти призводять до порушення фізико-колоїдного стану та руйнування складних ліпопротеїдних компонентів. Таку точку зору про механізм дії нафтопродуктів поділяє і Сміт, який вважає, що за їх дії клітинна мембрана набухає, а потім руйнується [25].

Високі концентрації нафти, можливо, призводять до появи великої кількості дефектних еритроцитарних клітин, а це в свою чергу обумовлює активацію еритропоезу [30].

В загальному можна констатувати відмінний характер змін кількості еритроцитів коропа за дії нафтових вуглеводнів порівняно із дією йонів металів феруму та купруму.

3.3.2. Гематокрит крові коропа за дії сирої нафти

Аналіз результатів дослідження показав зростання гематокриту за дії 20 ГДК сирої нафти та зниження гематокритного числа за впливу 30 ГДК токсиканта (рис. 3.6).

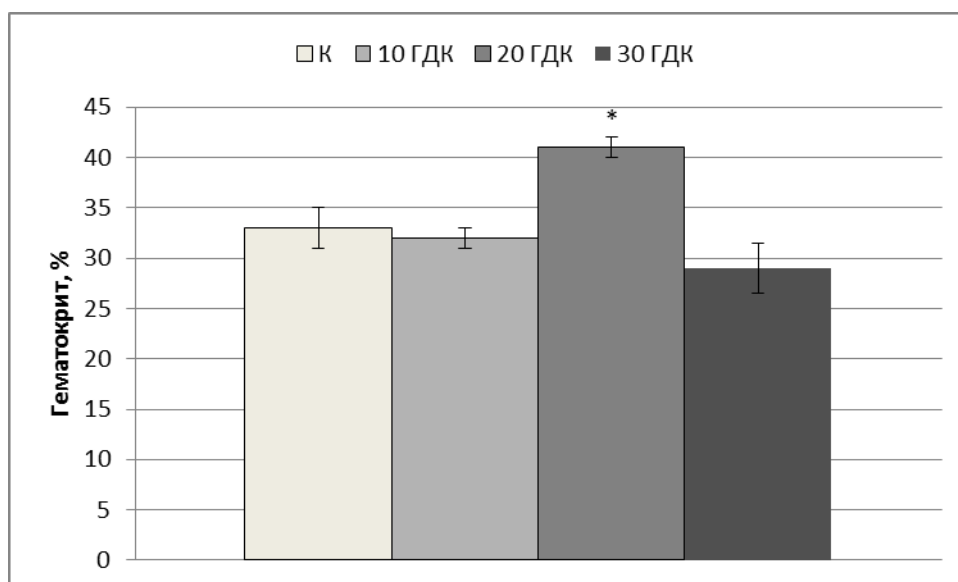


Рис. 3.6. Гематокрит крові риб за дії сирої нафти

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

Це може бути наслідком впливу нафти на еритропоез риб [15]. Очевидно,

що високі концентрації нафти призводять до глибоких змін в системі утворення, розвитку та загибелі формених елементів крові.

В загальному такі зміни можна вважати наслідком як токсичної дії аліфатичних та ароматичних компонентів сирової нафти, так і порушення нормального функціонування зябрового апарату [49].

3.3.3. Вміст гемоглобіну крові коропа за дії нафти

Гематологічні показники об'єктивно відображають фізіологічний стан організму. Вони варіюють в порівняно вузьких межах, специфічні для окремих видів і здатні відображати різні фізіологічні процеси і патологічні зміни організму. Гематологічні показники змінюються залежно від температури води, гідрохімічного режиму, складу кормів, сезону року, віку, стресових чинників і можуть виступати як специфічні маркери для оцінки фізіологічного стану організму риби. Вивчення динаміки гематологічних і біохімічних показників крові дозволяє визначити діапазон зміни параметрів усередині одного виду і масштаби фізіологічних перебудов за дії токсикантів різного походження в умовах тієї або іншої екологічної системи [10].

Вміст гемоглобіну може варіювати в доволі широких межах [22]. Максимальний вміст гемоглобіну спостерігається у активних пелагічних видів, а мінімальний – у малорухомих. В той же час за насиченості крові киснем спостерігається зворотна картина. В доних, малорухомих риб цей показник вищий, ніж у пелагічних активних. Цей факт цікавий з точки зору екологічних особливостей, але більше – для пояснення механізму стійкості риб до нафти та нафтопродуктів.

Динаміка вмісту гемоглобіну в крові коропа за дії сирової нафти має багато спільних рис із кількістю еритроцитів та вмістом білка плазми (рис. 3.7). Відмічається зростання кількості гемоглобіну крові коропа за дії 20 та 30 ГДК нафти. Це може бути обумовлено токсичною дією високих концентрацій нафти, внаслідок чого утворюються неактивні форми пігменту. Так, у авторів [26,32] за дії нафтових вуглеводнів відмічається зростання суми неактивних форм

гемоглобіну в основному за рахунок утворення метгемоглобіну.

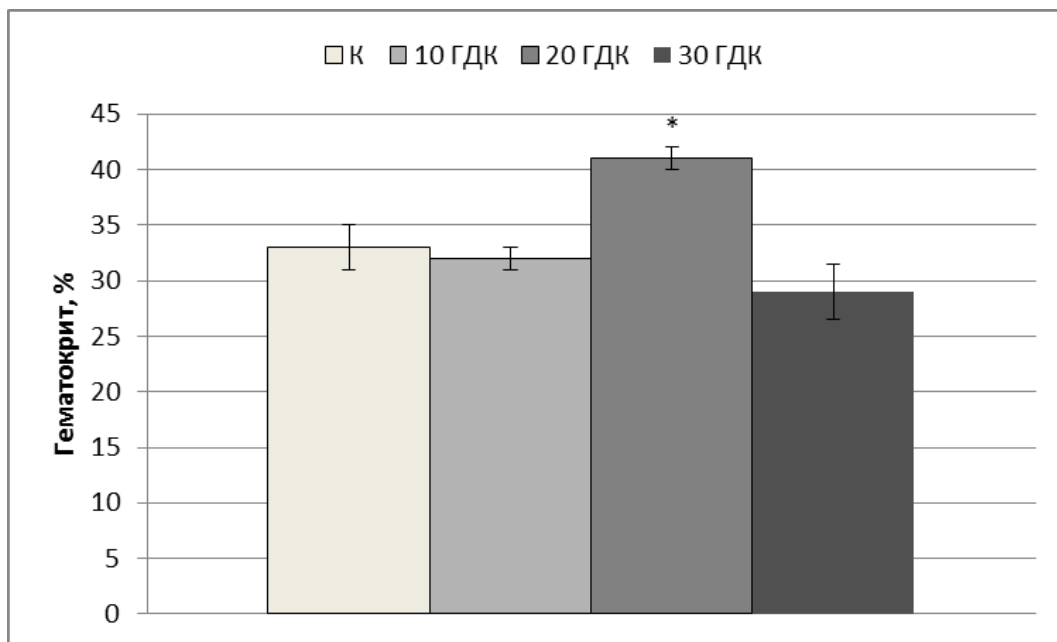


Рис. 3.7. Вміст гемоглобіну крові коропа за дії нафти; $M \pm m$, $n=5$.

При цьому з'являються еритроцити з неоднаково забарвленою цитоплазмою, що обумовлено нерівномірним розподілом гемоглобіну в клітині. Разом з тим, кількість еритроцитів і концентрація гемоглобіну, повинні бути високими, щоб забезпечити транспорт кисню до тканин.

Це також можна пояснювати значним накопиченням водорозчинних вуглеводнів рибами та їх впливом на структуру і синтез гемоглобіну. Короп активно накопичує водорозчинні фракції нафти, що знаходяться у воді або в кормі. Питомий вміст їх в тканинах значно перевищує такий у воді навіть при високих концентраціях нафти. Високий вміст нафтопродуктів виявляється в життєво важливих органах (печінка, нирки, міокард) вже через дві години після контакту з токсикантом. Виведення водорозчинні фракцій нафти з організму протікає значно повільніше, ніж процес накопичення, оскільки водорозчинні компоненти нафти утворюють комплекси з білками. Утворення стійких комплексів є, одним з чинників, що обумовлюють тривале знаходження водорозчинних фракцій нафти в організмі і її токсичний ефект [28].

3.3.4. Дія нафтових вуглеводнів на рівень білка в плазмі крові риб

На противагу людині і вищим тваринам у організм риб більшість отруйних речовин проникають осмотично – через зябра і шкіру, особливо пошкоджену. Тому токсичність у великій мірі залежить від розчинності речовини у воді і біологічних середовищах. Сполуки, розчинні у воді, отруйніші, ніж нерозчинні. Разом з тим через зябра, шкіру і слизову оболонку кишечника легко проникають і речовини, добре розчинні в ліпідах і тканинній рідині. Вони поступають в кров і розносяться по всьому організму. До них відносяться більшість органічних забруднювачів – вуглеводні, пестициди, детергенти і ін. [26].

Процес інтоксикації починається з патогенної дії отрут в місцях проникнення (зябрах, шкірі, слизових оболонках), а також рефлекторній реакції з боку нервової системи. Надалі, після попадання в кров отруйні речовини, з'єднуючись з білками, порушують фізико-хімічні процеси в плазмі [6].

Кров є поліфункціональною системою організму, що динамічно реагує на всі зміни як внутрішнього, так і зовнішнього середовища. Відомо, що зміни вмісту білка плазми, володіючи високою лабільністю, служать індикатором патологічних процесів в організмі [30].

Аналіз отриманих даних показав, що достовірно зростання білка плазми крові викликала лише максимальна із досліджуваних концентрацій (рис.3.4). Очевидно високі концентрації сирої нафти обумовлюють посилений розпад білків тканин, що в свою чергу сприяє зростанню їх кількості у крові риб. Разом з тим більшення вмісту білка можна пояснювати зростанням кількості альбуміну плазми, як адаптивне пристосування до порушення за дії нафти газо- та осморегуляції.

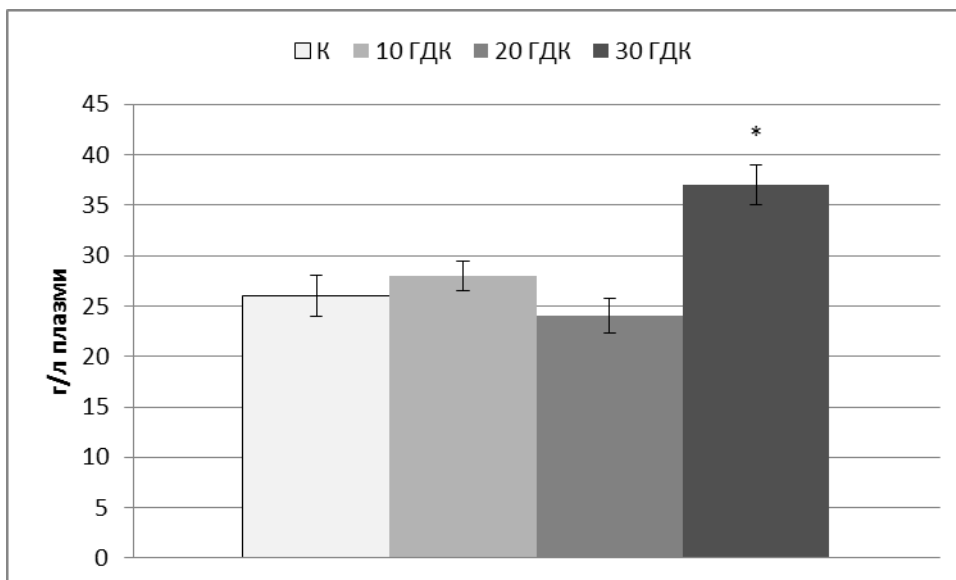


Рис. 3.8. Вміст білка у плазмі коропа за дії сирової нафти, $M \pm m$, $n=5$.

З іншої сторони, зростання кількості білка може проходити за рахунок глобулінів. Адже нафта і нафтопродукти можуть пригнічувати імунітет риб і викликати алергізацію організму [6].

В загальному, слід зазначити, що реакції крові на зміну функціонального стану особини у відповідь на дію токсикантів є неспецифічними і можуть бути використані як засіб діагностики нормального або патологічного стану.

Білки крові можуть виступити ефективними індикаторами для контролю таких складних фізіологічних процесів як осморегуляція, дихання, кровотворення, травлення специфічний і неспецифічний імунний захист організму, формування різних типів життєвої стратегії [10].

В загальному зміни кількості білка плазми крові риб за високих концентрацій нафти такі ж як і за дії високих концентрацій йонів металів, що свідчить про універсальність механізмів протидії інтоксикації в організмі гідробіонтів.

ВИСНОВКИ

Підвищені концентрації йонів Fe^{3+} , Cu^{2+} та сирої нафти призводять до суттєвої модуляції гематологічних показників коропа. Характер змін досліджуваних показників залежить від природи токсиканта та його концентрації у водному середовищі.

1. За дії 5 ГДК йонів Fe^{3+} та Cu^{2+} було відмічено зростання гематокриту, що, ймовірно є свідченням порушення еритропоезу. Кількість еритроцитів у дослідних групах не відрізняється від контрольних показників.

2. Підвищені концентрації нафти викликали зростання кількості еритроцитів. Гематокритне число зросло лише за дії 20 ГДК сирої нафти..

3. Характер змін вміст гемоглобіну крові коропа визначається природою металу. Так, за дії 5 ГДК йонів Fe^{3+} відмічено зростання кількості пігменту у 1,4 рази ($p < 0,05$), тоді як вплив 5 ГДК йонів Cu^{2+} призводив до достовірного зменшення його вмісту у 1,25 рази. За дії сирої нафти (20 та 30 ГДК) відмічено зростання концентрації гемоглобіну ($p < 0,05$), що може бути наслідком порушення газообміну.

4. Вміст білка плазми крові риб зростав за дії 5 ГДК йонів феруму, обох концентрацій йонів купруму та 30 ГДК сирої нафти. Очевидно, високі концентрації йонів металів та нафтових вуглеводнів прискорюють розпад білків тканин, що в свою чергу сприяє зростанню їх кількості у крові риб.

5. Гематологічні показники коропа можуть бути використані для оцінки забруднення водного середовища йонами металів та сирою нафтою.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Назарук М.М. (1999). Джерела забруднення гідросфери. Основи екології та соціоекології, Львів.: 153 с.
2. Горбатюк Л. О., Шаповал Т. Н., Миронюк М. О., Арсан О. М. (2008). Деякі аспекти забруднення нафтою водойм . *Гідробіол. журн.*, 44., 4., 88 – 101.
3. Причепа М.В., Потрохов О.С. (2016). Гормональне регулювання адаптивних процесів у риби за дії абіотичних чинників. *Гідробіол. журн.*, 52., 92–107.
4. Корнієнко В. І., Пономаренко О, В., Ладогубець О. В., Гаркуша І. В., Дученко К. А. (2020). Загальна токсикологія: навчально-методичний посібник з вивчення ветеринарної токсикології. Харків: РВВ ХДЗВА, 112 с.
5. Hayashi M., Ueda T., Uyeno K. [et al.](1998). Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutat. Res.*, 399., 125–133.
6. СклярOVA О.Я. (2004). Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення: Навч. посіб. для студ. мед. вузів III – IV рівнів акредитації. / За ред. О.Я. СклярOVA. К.: Здоров'я, 192 с.
7. Has-Schon E., Bogut I., Strelek I. (2006). Heavy metal profile in five fish species included in human diet, domiciled in the end flow river Neretwa. *Arch. Environ. Contam. and Toxicol.*, 50., 4., 545–551.
8. Jaroslav A. Concentration of selected metals in muscle of various fish species (2005). *J. Environ. Sci and Health.*, 40., 4., 899–912.
9. Попова Е.М., Кошій І.В. (2007). Ліпіди як компонент адаптації риби до екологічного стресу. *Рибогосподарська наука України.*, 1., 49-56.
10. Hnativ, R., Cherniuk, V., Khirivskyi, P., Kachmar, N., Lopotych, N., Hnativ, I. (2023). Processes of Natural Self-Cleaning of Small Watercourses with Increasing Anthropogenic Load in the Dniester River Basin. *Journal of Ecological Engineering*, 24(2)., 12–18. <https://doi.org/10.12911/22998993/156914>
11. Cholami M. (2005). A research about the amount of zinc absorption difference on *Cyprinus carpio* and carp . *Eur. Aquacult. Soc.*, 35., 219–220.

12. Люта Н. Г., Саніна І. В. (2023). Особливості розподілу вмісту важких металів у донних відкладах у різних природно-антропогенних умовах. *Мінеральні ресурси України*, 1., 35–38. URL: <https://doi.org/10.31996/mru.1.35-38>
13. Арсан В.О. (2004). Енергозабезпечення організму коропа при адаптації до змін концентрації іонів важких металів у водному середовищі: Автореф. канд. дис.: К.
14. Гавриш В.К. (1984). Нафта і навколишнє середовище., К.: Т-во "Знання" УРСР., 48 с.
15. Маляревська А.Я. (1985). Біохімічні механізми адаптації гідробіонтів до токсичних речовин. *Гідробіол. журн.*, 21., 3., 70-82.
16. Шапоров В. П., Шестопалов О. В., Мамедова О. О., Бахарєва Г. Ю. та ін. (2015). Біологічні методи охорони навколишнього середовища від забруднення нафтопродуктами: Монографія., Х. : НТУ «ХП», 216 с.
17. Нестеренко С. В. (2024). Хімія нафти та газу : конспект лекцій для здобувачів вищої освіти денної та заочної форм навчання зі спеціальності 185 – Нафтогазова інженерія та технології. Харків. нац. ун-т міськ. госп-ва ім. О. М. Бекетова. Харків : ХНУМГ ім. О. М. Бекетова, 134 с.
18. Дудник С.В., Євтушенко М.Ю. (2013). Водна токсикологія: основні теоретичні положення та їхнє практичне застосування [Монографія]. К.: Вид-во Українського фітосоціологічного центру, 297 с.
19. Курбатова І. М., Тупицька О. М. (2015). Вплив абіотичних факторів на організм прісноводних риб (літературний огляд). *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*, 2., 99–108.
20. Кучеров І.С. (1991). Фізіологія людини і тварин. К.: Вища школа, 178 -195.
21. Nazbije S. (2018). Effect of water quality in hematological and biochemical parameters in blood of common carp (*Cyprinus carpio*) in two lakes of Kosovo. *NEsciences*, 3(3), 323–332.
22. Склєрова О.Я. (2004). Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення: Навч. посіб. для студ. мед. вузів III – IV рівнів акредитації. К.: Здоров'я, 192 с.

23. Попов О.В. (1986). Основи біологічної хімії та зоотехнічного аналізу. К.: Вища школа, 247с.
24. Курант В.З. (2003). Роль білкового обміну в адаптації риб до дії іонів важких металів. Автореф. докт. дис. К.
25. Fitdgerald J.P. (1992). Comparative analysis of superoxide dismutase activities in a range of temperate and tropical teleost fish. *Comp. Biochem. and Physiol.*, 1018., 1/2., 111–114.
26. Menon N. N., Menon N. R. (1999). Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons from suspended oil borne sediments by the marine bivalve *Sunetta scripta*. *Aquat. Toxicol.*, 45., 63 – 69.
27. Paris-Palacios S. et al. (2002). Utilisation experimentale et environne des metallothioneines hepaticues en tant gue biomargueur che le gardon. *Bull. Soc. Zool.*, 127., 4., 315–328.
28. Zhang Chun-ling (2005). Huanjing yu jiankang zazhi. *J. Environ. Sci. and Health.*, 3., 511–605.
29. Matkovics B. et al. (1987). Paragat as an agent affecting antioxidant enzymes of common carp erythrozytes. *Comp. Bioch. and Physiol.*, 1., 217–219.
30. Lavarias S., Pollero R. J., Heras H. (2006). Activation of lipid catabolism by the water-soluble fraction of petroleum in the crustacean *Macrobrachium borellii*. *Aquat. Toxicol.*, 6., 77., 2., 190 – 196.
31. Abracham M. et al. (1996). A pyretroid type incecticide as aqn oxidative stress on carp. *24th Meeting of the FEBS, Barselona. — Abstracts: Boehringer Mannheim GmbH.*, 220.
32. Курант В.З., Столяр О.Б., Балабан Р.Б., Синюк Ю.В. (1997). Білково-нуклеїновий обмін в тканинах коропа під впливом марганцю, цинку та міді. *Наукові записки Тернопільського педагогічного університету. Сер. хімія.*, 1., С. 52 -57.
33. Беспалова Л.Е., Оліфіренко В.В., Рачковський А.В. (2011). Водна токсикологія: навчальний посібник. Херсон.: ВЦ «Колос», 131 с.
34. Radi R.A., Matkovits B. (1988). Effect of metal ions on antioxidant tnzimes, proten,

- contents of carp tissues. *Comp. Biochem. and Physiol.*, 90., 1., 69–75.
35. Toth L., Juhasz M. et al. (1996). An oxidative caused by contamination on carp. *24th Meeting of the FEBS.: Barselona.*, 218.
36. Кофанов В. І., Огняник М. С. (2008). Нормативно-методичне забезпечення визначення якості води при оцінці впливу на навколишнє середовище. *Екологія довкілля та безпека життєдіяльності.*, 4., 15–23.
37. Lowry J. O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. [et al.] (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193., 1., P. 265 – 275.
38. Дехтярьов П.А., Шерман І. М., Пилипенко Ю. В. [та ін.]. (2001). Фізіологія риб: практикум. К.: Вища шк., 128 с.
39. Li M., Zhang Q., Sun X., Karki K., Zeng C., Pandey A., Rawat B., Zhang F. (2020). Heavy metals in surface sediments in the trans-Himalayan Koshi River catchment: Distribution, source identification and pollution assessment. *Chemosphere.*, 244. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125410>
40. Хоменчук В. О., Рабченко О. О., Караїм У. В., Курант В. З. (2019). Використання гематологічних показників риб для оцінки забруднення водного середовища іонами Fe^{3+} . *Сучасні проблеми теоретичної та практичної іхтіології : матеріали XII міжнародної іхтіологічної науково-практичної конференції (26-28 вересня 2019 р., м. Дніпро). Дніпро : Акцент ПП*, 206-209.
41. Цуркан Л.В., Воліченко Ю.М., Шерман І.М. (2020). Еколого-гематологічні складові зимівлі цьоголітків коропа в умовах півдня України. *Водні біоресурси та аквакультура.*, 59-67. DOI <https://doi.org/10.32851/wba.2020.2.6>
42. Тучапська А.Я., Фріштак О. М. , Качай Г. В. (2014). Фізіолого-біохімічний статус та рибницькі показники цьоголіток любінського лускатого коропа, які вирощувались при різному вмісті природного корму у раціоні. *Біологія тварин.*, 16., 2., 134 -140.
43. Nemcsok J., Asztalos B., Vig E., Orban L. (1987). The effect of organophosphorus pesticide on the enzymes of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta biol. Hung.*, 38., 1., 77-85.
44. Camus L., Birkely S. R., Jones M. B. [et al.] (2003). Biomarker responses and PAH uptake in *Mya truncata* following exposure to oil – contaminated sediment in an Arctic

- fjord (Svaloard).. *Sci. Total Environ.*, 308.,1-3., 221 – 234.
45. Грубінко В.В., Смольський О.С., Коновец І.М., Арсан О.М. (1995). Гемоглобін риб при дії аміаку та солей важких металів. *Гідробіол. журн.*,4., 82-87.
46. Fernandes M.N., Mazon A.F. Fernandes M.N., (2003). Environmental pollution and fish gill morphology. *Fish Adaptation / Eds A.L. Val, B.C. Kapoor. – Enfield: Sci. Publ.*, 203–231.
47. Есипова,Н.Б., Шарамок Т.С., Федоненко.Е.В. Есипова Н.Б. (2005). Еколого-фізіологічна характеристика риби, які проживають в зоні антропогенного забруднення. *Наукові записки ТНПУ ім. В. Гнатюка. Сер. Біологія. Тернопіль*, 4(27)., 84-86.
48. Lorent M.T., Martos A., Castano A. (2002). Detections of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp. *Ecotoxicology.*, 11., 1., 27–34.
49. Науменко В.В., Дячинський А.С., Демченко В.Ю., Дерев'янко І.Д. (2009). Фізіологія сільськогосподарських тварин: практикум.- 3-тє вид., перероб. і доп. К.: ЦУЛ, 261 с.

ДОДАТКИ