

Міністерство освіти і науки України
Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

НАТАЛІЯ ВОВЧЕК

УДК: 597.551.2/597.552.1:546.73:577.1

ДИСЕРТАЦІЯ

МОРФОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ ПРІСНОВОДНИХ РИБ
ЗА ДІЇ ІОНІВ КОБАЛЬТУ

091 – Біологія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Наталія Вовчек

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Курант Володимир Зіновійович

Тернопіль 2025

АНОТАЦІЯ

Вовчек Н.О. Морфологічні та біохімічні показники прісноводних риб за дії іонів кобальту. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія. – Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Тернопіль, 2025.

Важкі метали є одними з основних забруднювачів довкілля через їхню токсичність, здатність зберігатися у воді та накопичуватися у водних організмах. Вони потрапляють у навколишнє середовище як з природних джерел, таких як руйнування гірських порід і виверження вулканів, так і внаслідок діяльності людини, зокрема через видобуток корисних копалин, з промислових та сільськогосподарських підприємств. Метали, як біологічно необхідні, так токсичні, у підвищених концентраціях є небезпечними через їх здатність до акумулювання, біомагніфікації та високу біологічну активність для гідробіонтів. Через це кількість металів у компонентах гідроекосистем має постійно моніторитись.

Кобальт належить до важких металів і є важливим мікроелементом. Він входить до складу вітаміну B_{12} і виступає як кофактор для багатьох ензимів. Кобальт відіграє важливу роль у багатьох метаболічних процесах та взаємодіє з ключовими біологічно активними речовинами, такими як піридоксин, полісахариди, дегідроаскорбінова кислота, рибофлавін та піридинові нуклеотиди. Як один із вітамінів групи В, Вітамін B_{12} (кобаламін) є критично важливим для клітинного метаболізму, зокрема для синтезу ДНК, еритропоезу та функціонування нервової системи. Кобальт у природних водних середовищах зустрічається в невеликих концентраціях. Зазвичай у незабруднених природних водах концентрація кобальту не перевищує кількох мікрограмів на кубічний дециметр.

Однак, у разі виникнення несприятливих умов, його вміст у поверхневих водах може значно зростати, спричиняючи його накопичення у компонентах гідроекосистем та здійснювати токсичний вплив на водні організми

Оцінка впливу іонів металів на водні екосистеми за допомогою біологічних показників є особливо інформативною. Вона дозволяє виявляти зміни з високою точністю та прогнозувати подальші наслідки. Крім того, такий підхід є економічно вигіднішим порівняно з традиційними фізико-хімічними методами аналізу води.

Тому мета дисертаційної роботи полягала у визначенні окремих морфологічних показників, а також біохімічного профілю крові, активності низки ферментів у прісноводних риб за дії сублетальних концентрацій іонів кобальту. З'ясувати накопичення досліджуваних іонів металу в тканинах риб та їх вплив на зазначені показники.

У модельних умовах було досліджено морфометричні та біохімічні показники карася сріблястого (*Carassius gibelio* Bloch.) та щуки звичайної (*Esox lucius* L.) за дії сублетальних концентрацій іонів Co^{2+} (0,1 та 0,25 мг/дм³). Час утримання риб у дослідних умовах становив 14 діб.

Експериментальні дослідження проведені в Тернопільському національному педагогічному університеті імені Володимира Гнатюка упродовж 2021–2025 рр.

У результаті аналізу морфометричних характеристик встановлено, що у досліджуваних видів риб значення більшості розмірних показників не відрізняються від контрольних. Проте, у карася за дії 0,1 мг/дм³ кобальту відзначено погіршення вгодованості та зміни пропорцій тіла (зниження коефіцієнтів великоголовості та широкоспинності). Спостерігалася також тенденція до зменшення печінково-соматичного індексу.

Для щуки характерні інші реакції: при 0,1 мг/дм³ кобальту змінювалися розміри голови та анального плавця. За вищої концентрації (0,25 мг/дм³) відбувалося збільшення довжини плавців та антедорсальної/антепектральної відстаней. Важливою відмінністю від карася є зростання маси печінки у щуки з підвищенням концентрації кобальту, що відобразилося у збільшенні печінково-соматичного індексу та індексів обхвату/прогинності. Однак, як і у

карася, коефіцієнти вгодованості та широкоспинності у щуки знижувалися за дії кобальту.

Проведені дослідження показали, що зміни гематологічних показників крові риб є видоспецифічними і прямо залежать від концентрації іонів металу у водному середовищі. Хоча сублетальні концентрації кобальту не впливали на його вміст у крові ні карася, ні щуки, варто зазначити, що у карася рівень кобальту в крові був приблизно вдесятеро меншим, ніж у щуки. У карася зростання кількості еритроцитів, гемоглобіну та значення гематокриту спостерігалось лише при відносно низькій концентрації іонів кобальту ($0,1 \text{ мг/дм}^3$), тоді як у щуки аналогічні зміни відбувалися за вищої концентрації ($0,25 \text{ мг/дм}^3$).

Підвищені концентрації кобальту (як $0,1 \text{ мг/дм}^3$, так і $0,25 \text{ мг/дм}^3$) викликали зростання рівня глюкози у крові обох досліджених видів риб. Щодо лактату, то у карася його концентрація підвищувалася за обох концентрацій кобальту, тоді як у щуки це спостерігалось лише за дії $0,25 \text{ мг/дм}^3$ іонів металу. Кількість пірувату в крові карася зростала при $0,25 \text{ мг/дм}^3 \text{ Co}^{2+}$, а у щуки — навпаки, знижувалася пропорційно до концентрації кобальту у воді. Зафіксовано пряму залежність між співвідношенням лактат/піруват та активністю лактатдегідрогенази у обох видів риб при дії підвищених концентрацій кобальту, що свідчить про посилення гліколітичних процесів у енергозабезпеченні, особливо у щуки, за високих концентрацій металу ($0,25 \text{ мг/дм}^3$).

Підвищені концентрації кобальту впливають на білковий склад крові риб, причому ці зміни є видоспецифічними. У карася загальний вміст білків у сироватці крові зростав на 18,9% та 24,8% при дії $0,1$ та $0,25 \text{ мг/дм}^3$ іонів кобальту відповідно. Натомість у щуки цей показник знижувався на 15,8% лише при вищій концентрації металу ($0,25 \text{ мг/дм}^3$).

Щодо фракційного складу плазми крові то у карася підвищені концентрації кобальту не викликали значних змін у кількості альбуміну та γ -

глобулінів. Проте, дія 0,1 мг/дм³ кобальту призводила до зменшення α_1 і α_2 -глобулінів та збільшення β -глобулінової фракції.

У щуки спостерігалися дещо інші зміни. Так, при 0,1 мг/дм³ кобальту відзначено зростання альбуміну та α_2 -глобулінів, а також зниження β - та γ -глобулінів. Вплив кобальту в кількості 0,25 мг/дм³ викликав зростання β -глобулінів та зниження γ -глобулінів у плазмі щуки. Значне зростання альбумін-глобулінового коефіцієнту було зафіксовано тільки у плазмі крові щуки при дії 0,1 мг/дм³ іонів кобальту.

Наступним етапом нашої роботи було дослідження окисного стресу в організмі прісноводних риб. Підвищені концентрації іонів кобальту викликали накопичення продуктів ПОЛ у крові щуки, тоді як у карася достовірних змін відмічено не було. Це вказує на вищу резистентність карася порівняно зі щукою до сублетальних концентрацій іонів кобальту. Вища із досліджуваних концентрацій іонів металу (0,25 мг/дм³) індукувала перекисне окиснення ліпідів у крові щуки, про що свідчило зростання рівня ТБК-активних продуктів, дієнових кон'югатів та гідропероксидів ліпідів. Натомість вплив меншої концентрації іонів Co^{2+} (0,1 мг/дм³) спричиняв зменшення вмісту малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів, що може вказувати на антиоксидантний ефект низьких концентрацій металу.

Дослідження активності каталази та супероксиддисмутази в плазмі крові риб виявили чітку залежність змін від концентрації іонів металу. Високі концентрації іонів кобальту у воді (0,25 мг/дм³) проявляли прооксидантну дію на організм риб, про що свідчить зростання активності ферментів антиоксидантного захисту у крові. Нижча концентрація іонів металу, в цілому, не виклика достовірних змін у функціонуванні ензимів.

Ферментативні системи є чутливими біоіндикаторами забруднення гідроекосистем металами. Активність ферментів може як зростати, так і знижуватися, залежно від таких чинників як концентрація забруднювача, його хімічна природа та шлях потрапляння в організм.

Проведено дослідження процесів трансамінування у тканинах карася та щуки при впливі іонів кобальту в концентраціях 0,1 та 0,25 мг/дм³. При цьому, спостерігалось зростання активності аспартатамінотрансферази у печінці обох видів риб при дії сублетальних концентрацій кобальту. Водночас, у м'язах та плазмі крові зміни були невірогідними. Щодо аланінамінотрансферази, то її активність змінювалася залежно від виду риб, типу тканини та концентрації металу. Так, у карася при концентрації 0,25 мг/дм³ кобальту у воді активність аланінамінотрансферази зростала у печінці, але знижувалася у плазмі крові. У щуки відзначалася активація даного ензиму у печінці та плазмі крові при 0,1 мг/дм³ кобальту, а також у м'язах при 0,25 мг/дм³ металу у воді. Загалом, реакція системи трансамінування у карася та щуки на інтоксикацію кобальтом вказує на перебудову амінокислотного та білкового метаболізму, що необхідно для забезпечення енергетичної та пластичної адаптації до стресового впливу токсиканта.

Було встановлено, що вплив сублетальних концентрацій кобальту спричиняє різноспрямовані зміни у функціонуванні лактатдегідрогенази. Дія іонів кобальту в концентрації 0,1 мг/ дм³ не викликала статистично достовірних змін активності лактатдегідрогенази у тканинах щуки та карася. Натомість, вплив 0,25 м/л іонів Co^{2+} призводив до активації ферменту в тканинах карася та печінці щуки, тоді як у зябрах щуки спостерігалось пригнічення ферментної активності лактатдегідрогенази.

Щодо функціонування сукцинатдегідрогенази, то високі концентрації іонів кобальту (0,25 мг/ дм³) призводили до помітніших змін у тканинах зябер, порівно з печінкою, як у карася, так і щуки, де спостерігалось зниження активності ензиму, що ймовірно обумовлюється інгібуванням системи аеробного енергозабезпечення. Разом з тим дія 0,1 мг/ дм³ іонів кобальту призводила до зростання активності ензиму у гепатоцитах риб.

Іони кобальту суттєво впливали на активність цитохромоксидази у риб, демонструючи тканинну та дозозалежну специфіку. У зябрах як карася, так і щуки, пригнічення цитохромоксидази зростало пропорційно до концентрації

кобальту у воді. Натомість, у печінці обох видів риб, обидві досліджені концентрації кобальту мали ідентичний інактиваційний ефект на цей фермент.

Риби є інформативними об'єктами для біоіндикації стану водного середовища. Зміни в їх морфометричних, гематологічних показниках, а також активності досліджуваних ферментів є інформативними індикаторами стану організму при впливі підвищених концентрацій іонів важких металів, зокрема кобальту. Дослідження сукупності цих параметрів дозволить оцінити витривалість риб до забруднення та прогнозувати зміни біоценозів у водоймах, забруднених важкими металами.

Ключові слова: *гідробіонти, риби, морфологічні та біохімічні показники, метаболізм, важкі метали, окисний стрес, адаптація.*

ABSTRACT

Vovchek Natalia Morphological and biochemical parameters of freshwater fish exposed to cobalt ions – Qualifying scientific work, rights as a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 Biology.
– Ternopil Volodymyr Hnatyuk National Pedagogical University, Ternopil, 2025.

Heavy metals are one of the main environmental pollutants due to their toxicity, ability to persist in water and accumulate in aquatic organisms. They enter the environment both from natural sources, such as the destruction of rocks and volcanic eruptions, and as a result of human activity, in particular through the extraction of minerals, from industrial and agricultural enterprises. Metals, both biologically necessary and toxic, are unsafe in elevated concentrations due to their ability to accumulate, biomagnificate and high biological activity for aquatic organisms. Because of this, the amount of metals in the components of hydroecosystems must be constantly monitored.

Cobalt is a heavy metal and an essential trace element. It is a component of vitamin B₁₂ and acts as a cofactor for many enzymes. Cobalt plays an important role in many metabolic processes and interacts with key biologically active substances such as pyridoxine, polysaccharides, dehydroascorbic acid, riboflavin and pyridine nucleotides. As one of the B vitamins, Vitamin B₁₂ (cobalamin) is critically important for cellular metabolism, in particular for DNA synthesis, erythropoiesis and the functioning of the nervous system. Cobalt is found in natural aquatic environments in small concentrations. Typically, in unpolluted natural waters, the concentration of cobalt does not exceed a few micrograms per cubic decimeter.

Assessment of the impact of metal ions on aquatic ecosystems using biological indicators is particularly informative. It allows you to detect changes with high accuracy and predict further consequences. In addition, this approach is more cost-effective compared to traditional physicochemical methods of water analysis.

Therefore, the purpose of the dissertation work was to determine individual morphological indicators, as well as the biochemical profile of the blood, the activity of a number of enzymes in freshwater fish under the influence of sublethal

concentrations of cobalt ions. To determine the accumulation of the studied metal ions in fish tissues and their effect on these indicators.

In model conditions, the morphometric and biochemical indicators of crucian carp (*Carassius gibelio* Bloch.) and pike (*Esox lucius* L.) were investigated under the influence of sublethal concentrations of Co^{2+} ions (0.1 and 0.25 mg/dm³). Experimental studies were conducted at the Volodymyr Hnatyuk Ternopil National Pedagogical University during 2021–2025.

As a result of the analysis of morphometric characteristics, it was found that in the studied fish species, the values of most dimensional indicators do not differ from the control ones. However, in crucian carp, under the influence of 0.1 mg/dm³ of cobalt, deterioration of fatness and changes in body proportions (decrease in the coefficients of large head and broad back) were noted. A tendency to decrease in the liver-somatic index was also observed.

Other reactions are characteristic of pike: at 0.1 mg/dm³ of cobalt, the sizes of the head and anal fin changed. At a higher concentration (0.25 mg/dm³), the length of the fins and the antedorsal/antepectral distances increased. An important difference from crucian carp is the increase in liver mass in pike with increasing cobalt concentration, which was reflected in an increase in the liver-somatic index and girth/curvature indices. However, as in crucian carp, the coefficients of fatness and broad back in pike decreased under the influence of cobalt.

The conducted studies have shown that changes in hematological parameters of fish blood are species-specific and directly depend on the concentration of metal ions in the aquatic environment. Although sublethal concentrations of cobalt did not affect its content in the blood of either crucian carp or pike, it is worth noting that in crucian carp the level of cobalt in the blood was approximately ten times lower than in pike. In crucian carp, an increase in the number of erythrocytes, hemoglobin and hematocrit values was observed only at a relatively low concentration of cobalt ions (0.1 mg/dm³), while in pike similar changes occurred at a higher concentration (0.25 mg/dm³).

Increased concentrations of cobalt (both 0.1 mg/dm³ and 0.25 mg/dm³) caused an increase in the level of glucose in the blood of both studied fish species. As for lactate, in crucian carp its concentration increased at both concentrations of cobalt, while in pike it was observed only at the action of 0.25 mg/dm³ of metal ions. The amount of pyruvate in the blood of crucian carp increased at 0.25 mg/dm³ Co²⁺, and in pike, on the contrary, it decreased in proportion to the concentration of cobalt in the water. A direct relationship was recorded between the lactate/pyruvate ratio and the activity of lactate dehydrogenase in both fish species under the action of increased concentrations of cobalt, which indicates an increase in glycolytic processes in energy supply, especially in pike, at high concentrations of metal (0.25 mg/dm³).

Increased concentrations of cobalt affect the protein composition of the blood of fish, and these changes are species-specific. In crucian carp, the total protein content in blood serum increased by 18.9% and 24.8% under the influence of 0.1 and 0.25 mg/dm³ of cobalt ions, respectively. In contrast, in pike, this indicator decreased by 15.8% only at a higher concentration of the metal (0.25 mg/dm³).

As for the fractional composition of blood plasma, in crucian carp, increased cobalt concentrations did not cause significant changes in the amount of albumin and γ -globulins. However, the effect of 0.1 mg/dm³ of cobalt led to a decrease in α_1 and α_2 -globulins and an increase in the β -globulin fraction.

In pike, slightly different changes were observed. Thus, at 0.1 mg/dm³ of cobalt, an increase in albumin and α_2 -globulins was noted, as well as a decrease in β - and γ -globulins. Exposure to cobalt in the amount of 0.25 mg/dm³ caused an increase in β -globulins and a decrease in γ -globulins in pike plasma. A significant increase in the albumin-globulin ratio was recorded only in pike blood plasma under the influence of 0.1 mg/dm³ cobalt ions.

The next stage of our work was the study of oxidative stress in the body of freshwater fish. Increased concentrations of cobalt ions caused the accumulation of lipid peroxidation products in the blood of pike, while no significant changes were observed in crucian carp. This indicates a higher resistance of crucian carp compared

to pike to sublethal concentrations of cobalt ions. The highest of the studied concentrations of metal ions (0.25 mg/dm^3) induced lipid peroxidation in the blood of pike, as evidenced by an increase in the level of TBA-active products, diene conjugates and lipid hydroperoxides. In contrast, the effect of a lower concentration of Co^{2+} ions (0.1 mg/dm^3) caused a decrease in the content of malondialdehyde and diene conjugates, which may indicate an antioxidant effect of low concentrations of the metal.

Studies of catalase and superoxide dismutase activity in fish blood plasma revealed a clear dependence of changes on the concentration of metal ions. High concentrations of cobalt ions in water (0.25 mg/dm^3) had a pro-oxidant effect on the fish organism, as evidenced by an increase in the activity of antioxidant defense enzymes in the blood. Lower concentrations of metal ions, in general, do not cause significant changes in the functioning of enzymes.

Enzyme systems are sensitive bioindicators of metal pollution of hydroecosystems. Enzyme activity can either increase or decrease, depending on such factors as the concentration of the pollutant, its chemical nature and the route of entry into the body.

A study of transamination processes in crucian carp and pike tissues under the influence of cobalt ions in concentrations of 0.1 and 0.25 mg/dm^3 was conducted. At the same time, an increase in the activity of aspartate aminotransferase was observed in the liver of both fish species under the influence of sublethal concentrations of cobalt. At the same time, changes in the muscles and blood plasma were implausible. As for alanine aminotransferase, its activity varied depending on the species of fish, tissue type and metal concentration. Thus, in crucian carp at a concentration of 0.25 mg/dm^3 of cobalt in water, the activity of alanine aminotransferase increased in the liver, but decreased in the blood plasma. In pike, activation of this enzyme was noted in the liver and blood plasma at 0.1 mg/dm^3 of cobalt, as well as in the muscles at 0.25 mg/dm^3 of metal in water. In general, the reaction of the transamination system in crucian carp and pike to cobalt intoxication

indicates a restructuring of amino acid and protein metabolism, which is necessary to ensure energy and plastic adaptation to the stressful effects of the toxicant.

It was found that the effect of sublethal concentrations of cobalt causes multidirectional changes in the functioning of lactate dehydrogenase. The effect of cobalt ions at a concentration of 0.1 mg/dm³ did not cause statistically significant changes in the activity of lactate dehydrogenase in the tissues of pike and crucian carp. In contrast, the effect of 0.25 mg/dm³ of Co²⁺ ions led to the activation of the enzyme in the tissues of crucian carp and pike liver, while in the gills of pike inhibition of the enzymatic activity of lactate dehydrogenase was observed.

Regarding the functioning of succinate dehydrogenase, high concentrations of cobalt ions (0.25 mg/dm³) led to more noticeable changes in the gill tissues, as well as in the liver, in both crucian carp and pike, where a decrease in the activity of the enzyme was observed, which is probably due to inhibition of the aerobic energy supply system. At the same time, the action of 0.1 mg/dm³ of cobalt ions led to an increase in the activity of the enzyme in fish hepatocytes.

Cobalt ions significantly affected the activity of cytochrome oxidase in fish, demonstrating tissue and dose-dependent specificity. In the gills of both crucian carp and pike, the inhibition of cytochrome oxidase increased in proportion to the concentration of cobalt in the water. However, in the liver of both fish species, both studied concentrations of cobalt had an identical inactivation effect on this enzyme.

Fish are informative objects for bioindication of the state of the aquatic environment. Changes in their morphometric, hematological indicators, as well as the activity of the studied enzymes are informative indicators of the state of the organism under the influence of elevated concentrations of heavy metal ions, in particular cobalt. Studying the set of these parameters will allow us to assess the resistance of fish to pollution and predict changes in biocenoses in water bodies contaminated with heavy metals.

Keywords: aquatic organisms, fish, morphological and biochemical indicators, metabolism, heavy metals, oxidative stress, adaptation.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, у яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Хоменчук В.О., Вовчек Н.О., Бияк В.Я., Рабченко О.О., Курант В.З. Комплексний підхід до оцінки забруднення важкими металами екосистем малих річок Західного Поділля. Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол., 2021, Т. 81, № 4. С. 51-61.
<http://dspace.tnpu.edu.ua/handle/123456789/26265>
2. Вовчек Н.О., Голіней Г.М., Хоменчук В.О., Курант В.З. Вплив підвищених концентрацій іонів Co^{2+} на морфометричні показники риб. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. В. Гнатюка. Серія: Біологія. 2023. Т. 83. № 3-4. С. 56-65.
<http://dspace.tnpu.edu.ua/handle/123456789/32747>
3. Марків В. С., Вовчек Н. О. Кобальт у водних екосистемах: форми знаходження, біологічне значення та токсичність для риб // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Сер. Біологія., 2024. Т. 84, № 2. С. 58-73. Doi: 10.25128/2078-2357.24.2.7
4. Вовчек Н. О., Хоменчук В. О., Курант В. З. Гематологічні показники в організмі прісноводних риб за підвищених концентрацій іонів кобальту. Доповіді НАН України. 2024. № 4. С. 64–71.
<https://doi.org/10.15407/dopovidi2024.04.064>
5. Вовчек Н. О. Вплив сублетальних концентрацій іонів кобальту (II) на гематологічні показники в організмі прісноводних риб // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Сер. Біологія., 2024. Т. 84, № 3-4. С. 16-21. Doi: 10.25128/2078-2357.24.3–4.2
6. Vovchek N. O., Markiv V. S., Khomenchuk V. O., Kurant V. Z. Activity of Transamination Processes in Freshwater Fishes under the Cobalt Ions Impact. Hydrobiological Journal. 2025. Vol. 61, Issue 1, P. 57-63. DOI: 10.1615/HydrobJ.v61.i1.50

7. Vovchek N. O., Markiv V. S., Khomenchuk V. O., Kurant V. Z. Fractional Composition of Blood Serum Proteins of Freshwater Fishes under the Cobalt Ions Impact. *Hydrobiological Journal*. 2025. Volume 61, Issue 3, P. 83-90. DOI: 10.1615/HydrobJ.v61.i3.60

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. Курант В. З., Хоменчук В. О., Марків В. С., Вовчек Н. О. Вміст кобальту в прісних поверхневих водах та його біологічна роль в організмі риб // Тернопільські біологічні читання — Ternopil Bioscience – 2022 : матеріали Міжнародної науково-практичної конференції (4–5 листопада 2022 р.). Тернопіль: Вектор, 2022. С. 72-75.
<http://dspace.tnpu.edu.ua/handle/123456789/27846>
2. Використання гематологічних показників риб для оцінки забруднення водного середовища іонами кобальту (II) / Н. О. Вовчек та ін. // Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience – 2023 : матеріали Міжнародної науково-практичної конференції присвяченої 100-річчю від дня народження відомої вченої-ботаніка, систематика і флориста, кандидата біологічних наук, доцента, завідувача кафедри ботаніки Шиманської Валентини Омелянівни (11–13 травня 2023 р.). Тернопіль : Вектор, 2023. С. 226-229. <http://dspace.tnpu.edu.ua/handle/123456789/29669>
3. Вовчек Н. О., Хоменчук В. О., Костик О. О., Курант В. З. Вплив сублетальних концентрацій іонів кобальту на фракційний склад білків сироватки крові карася та щуки // Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience – 2024 : матеріали VII Міжнародної науково-практичної конференції присвяченої 95-річчю від дня народження відомого вченого-фізіолога, мікробіолога і популяризатора науки, професора Кузьми Миколайовича Векірчика (18-19 квітня 2024 р.). Тернопіль: Вектор, 2024. С. 157-160.
<http://dspace.tnpu.edu.ua/handle/123456789/34058>

4. Вовчек Н. О., Голіней Г. М., Хоменчук В. О., Курант В. З. Розмірно-вагові характеристики прісноводних риб за дії сублетальних концентрацій іонів кобальту (II) // Сучасні проблеми біології, екології та хімії : збірник матеріалів VII Міжнародної науково-практичної конференції (25-27 квітня 2024 р.). Запоріжжя : Поліграфічний центр «СоруArt», 2024. С. 19-20.
5. Вовчек Н. О., В. С. Марків, О. О. Рабченко, В. О. Хоменчук, В. З. Курант Вплив сублетальних концентрацій іонів Co^{2+} на показники крові прісноводних риб. Перспективи гідроекологічних досліджень в контексті локальних та глобальних наслідків ведення воєнних дій: Збірник матеріалів IX з'їзду Гідроекологічного товариства України. - Дніпро, 2024.С.256-258.
https://www.dnu.dp.ua/docs/ndc/2024/materiali_konferenc/Hidrobiol_Zizd.pdf
6. Вовчек Н.О., Хоменчук В.О., Мяхкота О.П., Курант В.З. Процеси енергозабезпечення у риб за дії сублетальних концентрацій іонів кобальту (II) // Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience – 2025 : матеріали VIII Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 85-річчю хіміко-біологічного факультету ТНПУ (1-2 травня 2025 р.). Тернопіль: Вектор, 2025. С. 57-59.

Охоронні документи на об'єкти інтелектуальної власності

ЗМІСТ

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	26
1.1. Важкі метали як забруднювачі навколишнього середовища.....	26
1.2. Кобальт у водних екосистемах	28
1.3. Методи аналізу та контролю кобальту в гідроекосистемах	32
1.4. Метаболізм кобальту в організмі тварин	37
1.5. Токсичність кобальту для гідробіонтів	42
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	48
2.1. Умови утримання риб та відбір зразків тканин.....	48
2.2. Визначення вмісту металів у тканинах риб	50
2.3. Біохімічні методи дослідження	50
2.3.2. Дослідження загальних показників крові	50
2.3.3. Продукти перекисного окиснення ліпідів.....	52
2.3.4. Дослідження ферментів антиоксидантного захисту.....	54
2.3.5. Дослідження ензимів енергетичного обміну та переамінування.....	55
2.4. Статистичні методи обробки результатів дослідження	57
РОЗДІЛ III. ВПЛИВ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ІОНІВ Co^{2+} НА МОРФОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ РИБ	58
3.1. Морфологічні показники карася за дії іонів кобальту	58
3.2. Розмірні характеристики щуки за дії іонів кобальту	61
РОЗДІЛ IV. ЗМІНИ ГЕМАТОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ РИБ ЗА ДІЇ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ІОНІВ КОБАЛЬТУ У ВОДІ	64
4.1. Вміст кобальту у крові карася та щуки.....	64
4.2. Загальні показники крові риб	65
4.3. Вміст окремих метаболітів у крові риб.....	69
4.4. Активність лактатдегідрогенази у плазмі крові риб	72

4.5. Фракційний склад білків сироватки крові прісноводних риб за дії іонів кобальту.....	73
4.5.1. Загальний вміст білка у плазмі крові риб.....	74
4.5.2. Альбумін	75
4.5.3. Глобуліни	77
4.5.4. Аналіз співвідношення альбумін/глобуліни	82
РОЗДІЛ V. ПОКАЗНИКИ ОКИСНОГО СТРЕСУ В КРОВІ РИБ ЯК	
БІОМАРКЕРИ ІНТОКСИКАЦІЇ ІОНАМИ КОБАЛЬТУ	86
5.1. Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у крові риб за дії іонів кобальту.....	87
5.2. Роль каталази та супероксиддисмутази у знешкодженні АФК за дії іонів кобальту.....	90
РОЗДІЛ VI. ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ ФЕРМЕНТНИХ	
СИСТЕМ В ОРГАНІЗМІ ПРІСНОВОДНИХ РИБ ЗА ДІЇ ІОНІВ	
КОБАЛЬТУ.....	94
6.1. Процеси трансамінування за дії сублетальних концентрацій іонів кобальту.....	94
6.1.1. Активність АсАТ у риб за інтоксикації іонами кобальту	95
6.1.2. Активність АлАТ у тканинах риб за дії сублетальних концентрацій іонів кобальту	98
5.2. Процеси енергозабезпечення у риб за дії сублетальних концентрацій іонів кобальту.....	103
6.2.1. Акумуляція кобальту тканинами зябер та печінки	103
6.2.2. Активність лактатдегідрогенази в зябрах та печінці риб за інтоксикації іонами кобальту.....	106
6.2.3. Функціонування сукцинатдегідрогенази у тканинах карася і щуки за дії іонів Co^{2+}	108

6.2.4. Активність цитохромоксидази в зябрах та печінці риб за дії іонів кобальту (II).....	111
РОЗДІЛ VII. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	
ДОСЛІДЖЕННЯ	115
7.2. Інтегральна оцінка стану організму риб та навколишнього середовища на основі гематологічних показників.	115
7.2. Акмулювання металу тканинами риб як чинник токсичності	119
ВИСНОВКИ	127
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	129

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГДК – гранично допустима концентрація

АФК – активні форми кисню

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

КАТ – каталаза

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК-АП – ТБК-активні продукти

АсАТ – аспартатамінотрансфераза

АлАТ – аланінамінотрансфераза

ЛДГ – лактатдегідрогеназа

МДА – малоновий диальдегід

ДК – дієнові кон'югати

ГПЛ – гідропероксили ліпідів

СДГ - сукцинатдегідрогеназа

ЦО- цитохромоксидаза

ВСТУП

Прісноводні екосистеми відрізняються високою вразливістю до антропогенних чинників, що робить їх одними з найчутливіших екосистем на Землі. [39, 78]. Внаслідок водозабору та зарегулювання річок, інтродукції чужорідних видів і, особливо, забруднення від промисловості та сільського господарства, ці екосистеми є одними з найбільш змінених ландшафтів як у світі, так і в Україні. [4, 139, 147]. Особливо актуальною проблема забруднення поверхневих вод та ґрунтів стала для України після російського вторгнення [25].

Забруднення водойм металами через широке їх використання у промисловості та сільському господарстві за останні десятиліття набуло загрозливих масштабів і становить потенційну небезпеку як для водної біоти, так і для людей [107, 117, 193].

Унікальність поведінки важких металів у гідроекосистемах зумовлена їхньою нездатністю до деградації, на відміну від органічних сполук. Вони безперервно циркулюють у воді та накопичуються в донних відкладах у різних формах. [158, 163, 242].

Метали, як есенціальні (незамінні), так і неесенціальні (токсичні), у підвищених концентраціях є небезпечними через їх здатність до акумулювання, біомагніфікації та високу біологічну активність для гідробіонтів [75, 239]. Накопичення важких металів у організмі водних тварин здатне негативно впливати на білковий, ліпідний та вуглеводневий обміни, а також на функціонування ферментів і проникність біомембран. Ці порушення здатні призвести до ослаблення організму, проблем з ростом і розвитком. [26, 204, 239].

Кобальт належить до важких металів і є важливим мікроелементом, який у природних водних середовищах зустрічається в невеликих концентраціях. Зазвичай у незабруднених природних водах концентрація кобальту не перевищує кількох мікрограмів на кубічний дециметр [94]. Однак, у разі виникнення несприятливих умов, його вміст у поверхневих водах може значно

зростати, спричиняючи його накопичення у компонентах гідроекосистем та здійснювати токсичний вплив на водні організми [81, 103, 204].

Труднощі у визначенні рівня забруднення прісноводних водойм кобальтом зумовлені недостатньою кількістю чітких нормативних документів щодо його вмісту у воді. Така ситуація спостерігається навіть у розвинених регіонах світу, таких як Європейський Союз та США [21]. Тому, надзвичайно актуальним є питання моніторингу кобальту у компонентах гідроекосистем, зокрема нашої країни.

Оцінка впливу іонів металів на гідроекосистеми, що базується на біологічних параметрах є актуальною через її високу чутливість та прогностичний потенціал, а також меншу вартість порівняно з фізико-хімічними методами аналізу водного середовища [171, 229].

Використання біоіндикаторних видів гідробіонтів та специфічних біомаркерів дає можливість оцінити токсичний вплив металів на навколишнє водне середовище [123, 134].

Риб часто використовують як біоіндикатори для оцінки стану прісноводних екосистем, оскільки вони живуть у водному середовищі, яке є місцем накопичення хімічних і біологічних забруднювачів та дуже чутливі до будь-яких змін у ньому. Риби активно накопичують метали в своєму організмі [19] і тому молекулярні, біохімічні та фізіологічні їх показники можуть бути використані як біологічні маркери токсичності металів та слугувати для оцінки забруднення водного середовища ними [196].

Завдяки значній тривалості життя (2-10 років), більшість видів риб здатні відображати як швидкі, так і тривалі зміни параметрів водного середовища. [38, 90, 215, 229]. Особливо це стосується системи крові риб, яка відображає реакцію їх організму на дію токсичних чинників. Проте зміни гематологічних показників можуть бути різноманітними та не завжди специфічними для конкретного виду риб [215].

Для визначення рівня токсичності металів для риб переважно застосовують лабораторні дослідження, де можна точно встановити

небезпечну концентрацію кожного металу для окремого виду. Саме тому розробка та вдосконалення методів оцінки токсичності водного середовища є важливим і своєчасним завданням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась у межах держтематики «Дослідження токсикорезистентності прісноводних риб до дії чинників водного середовища» Державний реєстраційний номер 0122U001543. Науковий керівник проф. Курант В. З.

Метою дисертаційної роботи було здійснити порівняльну характеристику змін окремих морфологічних і біохімічних показників організму риб (карася та щуки) за дії підвищених концентрацій іонів Co^{2+} у воді.

Для реалізації зазначеної мети виконували наступні **завдання**:

1. Вивчити зміни морфометричних показників у карася та щуки за дії сублетальних концентрацій іонів кобальту (0,1 та 0,25 мг/дм³);
2. Дослідити рівень накопичення кобальту в крові досліджених риб;
3. Проаналізувати зміни гематологічних показників в організмі риб (кількість еритроцитів, концентрації гемоглобіну, глюкози, лактату, пірувату, білка) за дії іонів кобальту;
4. Дослідити вміст продуктів перекисного окислення (малоновий діальдегід, дієнові кон'юганти, гідропероксили ліпідів) в крові риб за впливу іонів кобальту;
5. Вивчити дію сублетальних концентрацій іонів кобальту на активність ферментів антиоксидантного захисту (каталази та супероксиддисмутази) у крові карася та щуки;
6. Дослідити участь лактатдегідрогенази, сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази у тканинах печінки та зябер риб в енергозабезпеченні процесів детоксикації;
7. Вивчити активність процесів переамінування в тканинах печінки та зябер карася та щуки за дії підвищених концентрацій іонів Co^{2+} ;

8. Проаналізувати можливість використання досліджених морфометричних та біохімічних показників для оцінки рівня забруднення водного середовища сполуками кобальту.

Об'єкт дослідження: фізіолого-біохімічні механізми адаптації прісноводних риб до дії іонів важких металів.

Предмет дослідження: вплив сублетальних концентрацій іонів кобальту на морфологічні та біохімічні показники в організмі прісноводних риб.

Методи дослідження: методи відбору тканин, центрифугування, морфометрія, мікроскопія, спектрофотометрія, ферментні, електрофорез, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше встановлено характер впливу підвищених концентрацій іонів кобальту у воді на морфологічні та деякі біохімічні показники в організмі карася та щуки. Зокрема, проаналізовано особливості накопичення кобальту в крові піддослідних риб та його вплив на кількість еритроцитів, гематокрит, гемоглобін, а також вміст метаболітів енергетичного обміну. Розширено знання про показники окисного стресу в крові риб як біомаркери інтоксикації іонами кобальту, а також особливості функціонування ферментних систем прісноводних риб за дії іонів дослідженого металу.

Показано роль системи крові риб у формуванні токсикорезистентності їх організму та розглянуто можливість використання отриманих результатів для оцінки стану оточуючого водного середовища.

На основі факторного аналізу запропоновано мінімальний набір біомаркерів у крові риб, що можуть бути використані для оцінки стану їх риб та рівня забруднення водного середовища кобальтом. Було виокремлено дві групи показників. Перша група включала : активність лактатдегідрогенази, аланін- та аспартамінотрансферази, загальний вміст білка, концентрація пірувату. Друга група показників відображала наявність окисного стресу риб:

концентрація дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду, активність супероксидисмутази.

Практичне значення отриманих результатів. Фізіолого-біохімічні характеристики тканин риб є об'єктивним відображенням стану водних організмів в певних гідрологічних умовах. Інформація про зміни морфологічних та біохімічних параметрів риб може бути застосована для створення швидких діагностичних методів виявлення біологічних ушкоджень, викликаних іонами важких металів. Це знаходить практичне застосування, зокрема, у розробці систем оцінки забруднення водойм металами у рибництві.

Також виявлено, що деякі метали, зокрема кобальт, є активними регуляторами обміну речовин у риб на основі чого можна передбачити їх використання в практиці годівлі з метою активування процесів їх розвитку та росту.

Теоретичні положення та практичні результати цієї роботи можна використовувати під час викладання навчальних курсів «Водна токсикологія», «Екологічна фізіологія і біохімія», «Експериментальна екологія», «Екологічний моніторинг» для здобувачів вищої освіти природничих спеціальностей.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проаналізовано літературні джерела за тематикою дисертаційного дослідження, здійснено підготовку та проведення експериментальних досліджень. Біохімічні методи дослідження та аналіз води проведено спільно із співробітниками НДЛ, а саме: Курантом В.З., Хоменчуком В.О., Марківим В.С.

Апробація результатів роботи. Результати дисертаційного дослідження доповідались на міжнародних та всеукраїнських конференціях, зокрема:

- Міжнародній науково-практичній конференції «Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience – 2022». Тернопіль, Україна, 4–5 листопада 2022 р.

- Міжнародній науково-практичній конференції «Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience – 2023», Тернопіль, Україна, 11–13 травня 2023 р.
- Міжнародній науково-практичній конференції «Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience – 2024» Тернопіль, Україна, 18–19 квітня 2024 р.
- VII Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії». Запоріжжя, Україна. 25-27 квітня 2024 р.
- IX з'їзді Гідроекологічного товариства України. Дніпро, Україна, 18-20 вересня 2024 р.
- Міжнародній науково-практичній конференції «Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience – 2025» Тернопіль, Україна, 1-2 травня 2025 р.

Публікації. За матеріалами дисертаційного дослідження опубліковано 13 праць, в тому числі 7 статей у фахових виданнях, 2 з яких індексуються у наукометричних базах даних Scopus, та 6 матеріалів тез доповідей на з'їздах та конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 157 сторінках комп'ютерного набору, складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, розділів отриманих результатів, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків та списку використаних джерел. Робота містить 45 рисунків, 4 таблиці. Бібліографічний список складає 243 джерела, з них 227 – латиницею.

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Важкі метали як забруднювачі навколишнього середовища

Важкі метали становлять серйозну загрозу для довкілля, оскільки є токсичними, довго зберігаються у водних системах і мають властивість біоаккумуляції в організмах. Основними джерелами їх надходження є природні процеси, такі як вивітрювання та вулканізм, а також антропогенна діяльність, включаючи видобуток корисних копалин, промислове виробництво та сільське господарство. Інтенсивна експлуатація природних багатств та їх застосування в різних галузях призвели до значного збільшення концентрації важких металів у навколишньому середовищі та до дисбалансу їхніх біогеохімічних циклів [30]. На відміну від органічних забруднювачів, важкі метали не руйнуються, а залишаються в компонентах водних екосистем протягом тривалого часу [178].

У зв'язку зі зростанням попиту на важкі метали, водні екосистеми опиняються під загрозою їх забруднення. Процес видобутку багатьох з них може призводити до накопичення цих елементів та пов'язаних з їх отриманням побічних продуктів у ґрунтах і водних джерелах [121].

У контексті їхньої ролі для біоти, важкі метали класифікуються як есенціальні та неесенціальні. Важливо зазначити, що їхня біологічна або токсикологічна активність спостерігається вже за вкрай низьких концентрацій і є видоспецифічною для гідробіонтів [225]. Есенціальні метали, включаючи мідь, цинк, хром, нікель, кобальт, молібден, залізо та інші, є важливими для життєдіяльності водних організмів, і їх дефіцит негативно впливає на метаболічні процеси. Неесенціальні метали, такі як кадмій, ртуть, олово та свинець, не виконують жодних доведених біологічних функцій. Водночас, перевищення допустимих рівнів у воді як есенціальних, так і токсичних металів призводить до їхнього накопичення в органах і тканинах гідробіонтів, що зумовлює їхню отруйну дію [19, 109, 178, 202].

На відміну від токсичних металів, для есенціальних існує ряд відомих механізмів, що контролюють їх вміст в організмі, включаючи обмеження

26

надходження, зв'язування та виведення. Здатність гідробіонтів регулювати концентрацію шкідливих металів є обмеженою та потребує подальшого вивчення [18, 185, 239].

Важливою особливістю металів є їхня здатність до біомагніфікації - зростання концентрації в організмах на вищих трофічних рівнях. Це явище підвищує ризик їхнього токсичного впливу, зокрема й на здоров'я людини, яка знаходиться на вершині харчових ланцюгів [42].

Кобальт є перехідним природним елементом - 0,0025% за масою у земній корі та $4,0 \cdot 10^{-8}\%$ у морській воді. Блискучий твердий кобальт має колір від сталевого-сірого до чорного. У родовищах він зазвичай пов'язаний з такими металами, як нікель, срібло, свинець, мідь та залізо. Важливо, що кобальт рідко видобувається самостійно, а є побічним продуктом при отриманні нікелю та міді [121].]. Завдяки своїм властивостям, кобальт є цінним матеріалом у багатьох сферах. У промисловості його використовують для створення жароміцних сплавів, необхідних для реактивних двигунів, а також для поліпшення характеристик магнітних матеріалів, акумуляторних батарей, сонячних і відновлюваних енергетичних систем. Він також виступає каталізатором у нафтовій промисловості. У виробництві кобальт цінується як яскравий синій пігмент для скла, кераміки та фарб. У сільському господарстві його застосовують як мікроелемент у складі мінеральних добрив [21]. Два радіоактивних ізотопи кобальту (^{57}Co , ^{60}Co) використовуються в ядерних реакторах та медицині [167]. Кобальт має медичний скринінговий рівень 2 мкг/л [205].

У водному середовищі кобальт найчастіше зустрічається у вигляді неорганічних та органічних сполук зі ступенями окиснення +2 та +3. На його вміст у природних водоймах суттєво впливають процеси спільного осадження та адсорбція на поверхні оксидів заліза та марганцю [121].

Кобальт зазвичай у прісноводних водоймах зустрічається в низьких концентраціях. Звичайні середні концентрації у прісній воді становлять близько 0,02 мкМ, але також повідомлялося про рівні до 1 мкМ. В місцях

видобутку корисних копалин, виробництв сушильних агентів, пігментів та каталізаторів концентрація кобальту у водному середовищі зростає [49].

1.2. Кобальт у водних екосистемах

Основні джерела надходження важких металів у водні екосистеми - це ерозія ґрунтів і гірських порід, а також діяльність людини. [105]. У водних екосистемах ці елементи можуть накопичуватися у воді, донних відкладах та гідробіонтах. Важкі метали у водних об'єктах можуть перебувати у розчинній або нерозчинній формі. Важливо, що нерозчинні сполуки металів можуть розчинятися при зміні фізико-хімічних параметрів, що призводить до вторинного забруднення поверхневих вод і створює небезпеку для гідробіонтів. [161].

Процеси, що відбуваються на межі води та донних відкладів, також впливають на якість поверхневих вод. Донні відклади можуть акумулювати велику кількість органічних та неорганічних сполук важких металів. Характеристики водних екосистем визначаються сукупністю взаємодіючих фізичних і хімічних параметрів [68].

Фонові концентрації кобальту, що є природним вмістом елемента у воді через геологічну активність, присутні практично у всіх водних об'єктах. Величина цього фону може варіюватися навіть у межах однієї водойми під дією багатьох чинників, таких як рН, вміст розчиненого кисню, окисно-відновний потенціал, солоність, температурний режим, склад водної біоти та характеристики донних відкладів. Зокрема, донні відклади з високим вмістом марганцю або заліза можуть ефективно адсорбувати майже весь розчинений у воді кобальт [67].

Концентрація кобальту у прісноводних екосистемах варіює від дуже низьких (нг/дм^3) у антропогенно незмінених водоймах до високих (мг/дм^3) у забруднених екосистемах [65].

Дослідження прісноводних водойм Британської Колумбії показали значний діапазон концентрацій кобальту: від мінімальних виявлених значень

(0,1 мкг/дм³) до екстремально високих (27 000 мкг/дм³). Зазвичай у незабруднених природних водах рівень загального та розчиненого кобальту є низьким (до 5 мкг/ дм³), проте у водних екосистемах, що зазнали впливу шахтних вод, спостерігаються значно вищі концентрації цього металу. Максимальні рівні кобальту, зафіксовані у прісних водах Канади, склали 4,0 мкг/дм³ (річка Св. Лаврентія), 5,0 мкг/дм³ (річка Макензі) та 5,1 мкг/дм³ (річка Нельсон) [206].

Разом з тим, вміст кобальту в інших водних об'єктах, таких як естуарій річки Гудзон, затока Сан-Франциско та узбережжя Аль-Хобар (Саудівська Аравія) були нижчими та становили 0,029–3,230 мкг/дм³; 0,028–4,236 мкг/дм³ і 0,10–0,80 мкг/дм³ відповідно [28].

За даними авторів [137] концентрації кобальту в прісноводних водоймах можуть становити від 0,1 нМ до 1,3 мМ у зонах антропогенного забруднення [130].

Автори [21] визначили, що середня концентрація розчиненого кобальту у великих річках світу становить близько 0,15 мкг/дм³, причому середні показники для цих річок варіюються від менше ніж 0,02 до 0,40 мкг/дм³. У чистих прісних водах концентрація кобальту зазвичай знаходиться в межах 0,04–8,0 мкг/дм³. Істинно розчинні форми кобальту відрізняються великою різноманітністю, що пояснюється реакціями гідролізу, гідролітичної полімеризації та утворенням комплексних сполук з різними лігандами. [139]. Аналіз співвідношення загальної та розчиненої концентрації кобальту у водних зразках показав, що переважна кількість металу, присутнього в експериментальних розчинах, була в розчиненій формі. [21]. Найбільш стабільною формою для цього металу у прісній воді є значення рН близьке до нейтрального [136].

В морській та прісній воді кобальт найчастіше трапляється у вигляді хімічних сполук, де кобальт має ступінь окиснення +2, зокрема у вигляді хлоридів, карбонатів і сульфатів [103, 158]. Co^{2+} є переважаючим ступенем

окиснення через невисоку розчинність сполук трьоахвалентного кобальту, які є термодинамічно нестабільними в природних умовах (низькі значення окисно-відновного потенціалу та $pH \approx 7$) [137].

У водній фазі кобальт може існувати в різних формах: гідратованій, у складі комплексів з органічними або неорганічними лігандами, а також у зв'язку з суспендованими колоїдними речовинами через кулонівські або ковалентні зв'язки. Після потрапляння у воду кобальт утворює різноманітні неорганічні та органічні комплексні сполуки та сорбується на частинках. Він також демонструє відносно високу спорідненість до гумінових та фульвових кислот, які природно присутні у водних екосистемах [139].

Розчинність кобальту залежить від здатності утворювати різні комплексні сполуки, тому цей процес необхідно враховувати при його визначенні. Стереохімія комплексів двовалентного кобальту відрізняється значною різноманітністю, включаючи такі поширені геометричні форми, як тетраедрична, квадратно-плоска та октаедрична. Іони $Co(II)$ частіше утворюють стабільні комплекси з лігандами, які містять O- та N донори. За відсутності органічних сполук, здатних утворювати комплекси, значна кількість іонів кобальту(II) зв'язується з карбонатними іонами. Введення органічних лігандів до системи істотно впливає на хімічний стан $Co(II)$, призводячи до того, що більше половини закомплексованого кобальту(II) утворює цитратні та фульватні комплекси. Проте, навіть за наявності цих органічних комплексоутворювачів, значна частина металу все ще присутня у вигляді карбонатних та гідрокарбонатних комплексів [112]. У хімії утворення зв'язку "метал – вуглець" вважається досить нетиповим явищем, яке рідко зустрічається в природних умовах. Кобаламінові комплекси на сьогодні є унікальним прикладом існування такого типу хімічного зв'язку [239].

Для контролю якості природних вод розчинність мінералів зазвичай оцінюють, враховуючи оксиди, гідроксиди та карбонати металів. За високих значень pH утворення карбонату кобальту може призвести до зменшення концентрації іонів кобальту у воді. Кобальт також здатний заміщати інші

метали в кристалічних ґратках багатьох мінералів через подібні геохімічні характеристики, утворюючи змішані сульфати, карбонати та гідроксиди, що також може обмежувати його розчинність. Співосадження або сорбція металу на поверхні оксидів марганцю та заліза є важливим чинником його мобільності. Кобальт проявляє більшу схильність до зв'язування з оксидом марганцю порівняно з іншими двовалентними металами. Процес сорбції кобальту зазвичай посилюється зі зростанням рН, досягаючи піку ефективності при рН близько 6,5, а потім знижується при більш високих значеннях рН (понад 8) [207].

Аналіз наукових джерел показав значну різницю у розподілі кобальту між різними фракціями у прісноводних екосистемах. У відносно чистих річках (Амазонка та Юкон) розчинена форма кобальту становила менше 2%, адсорбована – 5–8%, осаджена та співосаджена – 27–29%, пов'язана з неорганічними твердими речовинами – 13–19%, а найбільша частка містилася у кристалічних відкладах – 44–50%. У річках Хау і Хоуп розподіл був іншим: розчинений кобальт – 8%, адсорбований – 31%, осаджений та співосаджений – 21%, в органічних формах – 11%, а у кристалічних відкладах – 29% [206].

Вміст розчинених та зважених фракцій кобальту у прісній воді демонструє значну варіабельність. Так, у річці Дунай частка розчиненого кобальту змінювалася в широкому діапазоні – від 14,0% до 72,6% від сумарної кількості. Для порівняння, в інших річках цей показник складав: 14% у Ріо Пуерко, від 96,8% до 98,6% у Джо Мілл-Крік та від 2% до 5% у річці Колумбія. Цікаво, що в озері Вашингтон кобальт майже повністю був представлений розчиненою формою [206].

Аналіз металів у донних відкладів є основним способом оцінки забруднення водного середовища, оскільки концентрація металів у них зазвичай значно перевищує їхній вміст у самій воді. Таким чином, виявлення підвищених рівнів металів у донних відкладах може слугувати свідченням забруднення, пов'язаного з діяльністю людини. Вода, що знаходиться між частинками донних відкладів, може містити значні концентрації металів і

впливати на їхній вміст у придонних шарах води через дифузію, осадження, перемішування біотою та інші процеси [46].

У дослідженнях [175] показано, що загальний вміст кобальту у воді корелював із загальним вмістом металу у донних відкладах ($R_{\text{Спірмена}}=0,75$), а біодоступність металу була високою.

Таким чином, кобальт є невід'ємною складовою природних водних ресурсів. Його вміст може коливатися в широкому діапазоні – від нанограмів на літр у екологічно чистих системах до міліграмів на літр у водоймах, що зазнали антропогенного впливу. Залежно від характеристик середовища, таких як рН, окисно-відновний потенціал та наявність адендів, кобальт може перебувати в різних ступенях окиснення та утворювати численні неорганічні й металоорганічні сполуки у розчиненій, колоїдній, дисперсній формах або у складі суспензій. Різноманітність форм металу та їхнє непостійне співвідношення створюють складності для оцінки його концентрації, хімічного стану та потенційної токсичності для водних організмів, що вимагає розробки ефективних аналітичних методів.

1.3. Методи аналізу та контролю кобальту в гідроекосистемах

З метою охорони водних екосистем, особливо питного та рибогосподарського призначення, необхідно регулярно здійснювати екологічний аналіз на наявність важких металів та їхніх сполук. Це зумовлено тим, що їх концентрація у природних водах часто є близькою до критичних значень. Навіть невеликі, безпечні рівні цих речовин можуть призводити до хронічного отруєння мешканців водойм. Хоча необхідність визначення хімічних форм металів у природних водах була усвідомлена вже давно (близько двох десятиліть тому), лише сучасні аналітичні методи зробили цю задачу практично здійсненою [158].

Під час екологічного аналізу водних екосистем ключове значення мають правильний відбір проб та коректне тлумачення отриманих даних. Основні принципи взяття проб для визначення вмісту металів включають наступні критерії:

- зразок, що відбирається, має відображати типові характеристики досліджуваної водної системи в цілому;
- процеси відбору, зберігання, транспортування та підготовки проби до аналізу повинні гарантувати незмінність концентрації досліджуваних речовин та властивостей води з моменту її взяття;
- спосіб консервування та необхідний об'єм проби визначаються обраним методом лабораторного дослідження;
- усі умови та обставини взяття проби підлягають чіткій фіксації та документуванню [3].

Для визначення важких металів у воді найчастіше застосовують такі аналітичні методи:

- атомно-абсорбційна спектрометрія (ААС) у графітовій печі;
- атомно-абсорбційна спектрометрія з полум'яним детектором;
- мас-спектрометрія з індуктивно зв'язаною плазмою (ICP-MS);
- атомно-емісійна спектроскопія з індуктивно зв'язаною плазмою (ICP-AES) [227].

Метод ICP-AES вирізняється надзвичайно високою чутливістю, дозволяючи виявляти концентрації менше ніж $0,02 \text{ мкг/дм}^3$. Атомно-абсорбційна спектрометрія (ААС) має дещо нижчі показники точності та чутливості (близько 20 мкг/л). Ліміти вимірювання вмісту важких металів за допомогою інших методів коливаються в межах $0,7\text{--}3 \text{ мкг/дм}^3$.

Для визначення концентрації металів у воді також застосовуються колориметричні методи, які характеризуються нижчою чутливістю та точністю. Фотометричні методи є практичним вибором, коли висока чутливість вимірювань не є критичною, завдяки їхній відносній простоті та економічності. Серед електрохімічних методів найбільш поширеними є потенціометрія, методи з використанням іонно-селективних електродів (ICE) та інверсійна вольтамперометрія (Anodic stripping voltammetry ASV) [135]. Анодна інверсійна вольтамперометрія (ASV) передбачає попереднє електрохімічне концентрування аналіту. Натомість, в адсорбційній катодній

вольтамперометрії (Ad-CSV) попереднє концентрування комплексів металів здійснюється хімічно шляхом додавання до проби відповідного ліганду [137].

Перелічені методи аналізу надають інформацію лише про загальну кількість металу у пробі, не розкриваючи різноманіття його форм у воді. Для розділення та визначення окремих форм ці методи поєднують з різними техніками розділення та концентрування металів, такими як: екстракція, рідинна іонна хроматографія, газова хроматографія та електрохімічні методи і т.д. [50].

Для визначення загальної концентрації важких металів у природних та стічних водах, що характеризуються значним вмістом органічних сполук, багато аналітичних методик вимагають попередньої підготовки проби. Найчастіше застосовується метод мокрого озолювання, який може включати 20-хвилинне кип'ятіння проби з хлоридною кислотою (HCl) та пероксидисульфатом амонію $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$ або обробку проби кип'ятінням у суміші концентрованих сульфатної (H_2SO_4) та нітратної (HNO_3) кислот з наступним випарюванням до появи парів сірчаної кислоти [158].

Міжнародний стандарт, що регламентує визначення ряду елементів, серед яких і кобальт, був порівняно недавно прийнятий в Україні на національному рівні [3].

Цей метод кількісного аналізу базується на вимірюванні інтенсивності світла, яке випромінюють атоми досліджуваних елементів. Збудження атомів відбувається шляхом розпилення аналізованої проби в аргонівій плазмі, що генерується індуктивно зв'язаним радіочастотним електромагнітним полем.

Визначення загального вмісту елементів у воді здійснюється за наступним протоколом: одразу після або під час відбору проби її підкислюють нітратною кислотою до досягнення рН 2. Фільтрація проби не проводиться. Аналіз слід виконати якомога швидше. У випадку утворення осаду, його розчиняють шляхом додавання кислоти при нагріванні. Контрольну (холосту) пробу обробляють за аналогічною процедурою.

Аби визначити розчинені елементи, пробу води спершу очищають від зважених часток, пропускаючи її через мембранний фільтр (0,45 мкм). Далі отриманий фільтрат підкислюють концентрованою нітратною кислотою, доводячи рН до значення менше 2, що необхідно для стабілізації елементів.

Для визначення елементів у суспендованій формі відібраний об'єм свіжої, неконсервованої проби одразу ж фільтрують крізь мембранний фільтр. Фільтр із затриманими частинками поміщають у спеціальний контейнер для подальшого зберігання та транспортування.

Потім цей мембранний фільтр розміщують у скляній хімічній склянці, додають 4 мл HNO_3 . Склянку накривають годинниковим склом і обережно нагрівають до повного розчинення твердого осаду, що залишився на фільтрі. Після майже повного випаровування кислоти склянку охолоджують. Далі додають 3 мл азотної кислоти і знову проводять випаровування проби. Після охолодження до проби доливають 10 мл HCl та 15 мл води, обережно розчиняючи можливий осад при слабкому нагріванні. Зразок піддають повторному охолодженню, після чого годинникове скло та внутрішні поверхні склянки промивають мінімальним об'ємом води. Отриманий розчин підлягає фільтруванню з метою видалення нерозчинної фази. Далі розчин доводять водою до необхідного кінцевого об'єму, який визначається очікуваною концентрацією аналізованих елементів. Кількісне визначення виконується методом калібрувального графіка.

Часто в національних та міжнародних протоколах пропонують атомно-абсорбційну спектроскопію [116]. Стандарт ISO 8288 описує три варіанти визначення металів у воді за допомогою атомно-полум'яної абсорбційної спектрометрії. Метод А передбачає пряме вимірювання. Метод В включає попереднє екстракційне вилучення хелатів досліджуваних металів з використанням 1-піролідиндітіокарбамату амонію та метилізобутилкетону. Метод С також використовує екстракційне вилучення хелатів металів, але при рН 2–4 з гексаметиленамонієм-гексаметилендітіокарбаматом у суміші розчинників диізопропілкетон-ксилол. Метод А є прийнятним для проб з

відносно високими концентраціями важких металів за відсутності значних перешкод. У випадках складного або невідомого складу проб, а також при високому вмісті розчинених мінеральних речовин, рекомендується застосовувати методи В або С.

Таким чином, завдяки розвитку сучасних аналітичних методів, тепер можна з високою чутливістю та точністю визначати різні форми металів у поверхневих водах. Деякі передові техніки здатні досягати меж визначення порядку 10-15 г [3].

Однак, попри наявність високочутливих та точних методів аналізу, отримані дані часто не дають вичерпної картини якості води, особливо у рибогосподарських водоймах. Це пояснюється тим, що ці методи не завжди дозволяють оцінити потенційну біологічну небезпеку води для водних організмів. Річ у тім, що токсичність важких металів у водних екосистемах визначається цілою низкою факторів навколишнього середовища [116, 241]. Отже, для більш глибокої та інформативної оцінки токсичності водних екосистем і якості води перспективними є методи біоіндикації та біотестування. Ці методи, що часто використовуються як доповнення до фізико-хімічного аналізу важких металів, дозволяють отримати уявлення про біологічну небезпеку забруднення.

Практично всі групи водних організмів (водорості, водні рослини, планктонні та бентосні безхребетні, а також хребетні тварини, включно з рибами) можуть слугувати біоіндикаторами якості природних і стічних вод. Кожна з цих груп гідробіонтів має свої переваги й недоліки як біологічний індикатор, що визначає її придатність для оцінки забруднення водойм важкими металами. Зважаючи на те, що риби постійно перебувають у водному середовищі, вони здатні відображати рівень його забруднення і, таким чином, можуть бути ефективно використані для біологічного моніторингу якості води [35, 38, 121, 179, 210, 231].

Біоіндикація надає комплексну оцінку стану водної екосистеми, відображаючи не лише накопичення важких металів, але і загальний стан

гідроекосистеми. Тому, ретельний вибір біоіндикаторів серед усіх видів, що населяють водойми, не тільки покращить виявлення забруднення водних об'єктів, але й сприятиме своєчасному вжиттю заходів з детоксикації. Це може виявитися економічно вигіднішим, ніж ліквідація наслідків на пізніх стадіях, коли токсичні речовини можуть завдати незворотної шкоди біоті водного середовища. Гідробіонти є цінними біологічними індикаторами, оскільки дозволяють відстежувати динаміку концентрації важких металів у водоймах протягом періоду, що відповідає їхньому життєвому циклу. Однак, використання риб як біоіндикаторів не завжди оптимальне, адже стрес є універсальною реакцією на порушення гомеостазу будь-якого біоіндикатора. Стресові стани у риб можуть призвести до значних економічних збитків у галузі аквакультури [32].

Біомаркери являють собою сигнальні індикатори в біологічних системах, що свідчать про вплив факторів навколишнього середовища, які можуть мати хімічну, фізичну або біологічну природу [121]. Комплекс біомаркерів, що використовуються для оцінки стану риб, може охоплювати активність ферментів біотрансформації, показники окислювального стресу, репродуктивні функції, стан ендокринної системи, генотоксичні ушкодження, а також фізіологічні та імунологічні параметри [93].

Отже, для дієвої оцінки та контролю якості водних екосистем є необхідною і своєчасною розробка комплексних інтегрованих підходів, що поєднують фізико-хімічні та біологічні методи дослідження.

1.4. Метаболізм кобальту в організмі тварин

Існують різноманітні шляхи надходження та елімінації важких металів в організмі риб. Щодо кобальту, основними шляхами його поглинання є зябра, кишківник і шкіра. Цікаво, що підвищення концентрації кальцію у воді може знижувати інтенсивність поглинання цього металу. Відомо, що кальцієві канали беруть участь у процесі захоплення важких металів, тоді як кальцій-залежні АТФази клітинних мембран відіграють важливу роль у їхньому виведенні з організму [49, 121, 178].

Після абсорбції в організм риб, метали через кровотік переносяться до різних органів і тканин. У плазмі крові кобальт зв'язується з альбуміном, причому частка вільного, іонізованого Co^{2+} становить близько 6-11% від загальної концентрації кобальту. В еритроцитах тварин механізм мембранного транспорту кобальту схожий на транспорт кальцію. Однак, цей процес поглинання є практично незворотним, оскільки кобальт ефективно зв'язується у цитозолі клітин крові [204]. Зазвичай метали мають властивість акумулюватися в метаболічно активних органах, таких як печінка, нирки, селезінка, зябра тощо [30, 53, 199].

Найбільш дослідженими органами в контексті кумулювання металів є зябра та печінка риб [44, 46, 108, 178].

Акумуляція важких металів, зокрема кобальту, має тенденцію зростати з часом у печінці, корелюючи зі збільшенням розмірів тіла. Це пов'язано з високим вмістом металотіонеїнів у цьому органі, які відіграють ключову роль у процесах регуляції та виведення металів з організму [157].

Важливо зауважити, що м'язова тканина акумулює кобальт у меншій мірі, проте відносна концентрація цього металу в м'язах зростає з часом після його надходження в організм. Крім того, рівень накопичення кобальту може варіюватися залежно від біологічних особливостей риби, включаючи її вік, довжину тіла, масу, харчові вподобання, місце існування та поточний метаболічний стан [30, 122, 178]. Хижі види риб, як правило, накопичують високі рівні металів, що є свідченням біомагніфікації цих елементів у харчовому ланцюгу [140].

Прісноводні риби виявляють більшу схильність до накопичення важких металів порівняно з морськими. Ця різниця зумовлена особливостями процесу осморегуляції, що в прісноводних видів пов'язаний з втратою солей та активним поглинанням води з навколишнього середовища [150], і вони є більш чутливими до промислового та побутового впливу.

Накопичення важких металів в організмі риб залежить від багатьох факторів довкілля. До них належать концентрація та біодоступність металів у

воді, а також фізико-хімічні властивості води та кліматичні умови. У самій воді на біодоступність, накопичення та токсичність важких металів для водних організмів значно впливають такі параметри, як температура, рівень розчиненого кисню, рН, жорсткість (вміст іонів кальцію та магнію), солоність, лужність та концентрація розчиненого органічного вуглецю [38], а також є ключем для розуміння їх поведінки у гідроекосистемах [121].

Більшість кобальту виводиться з організму риб разом із сечею та калом. [226]. Важливу роль у екскреції металів з організму відграють нирки [58]. У тварин процес виведення металів нирками на початковому етапі відбувається досить швидко, проте протягом перших кількох днів його інтенсивність знижується. Після цього настає друга, більш повільна фаза екскреції, яка може тривати кілька тижнів. Характерною особливістю є значне довгострокове утримання металів у тканинах, що може спостерігатися протягом кількох років.

Слід зазначити, що кобальт є життєво важливим мікроелементом для тваринного організму. Він входить до складу вітаміну B_{12} і виступає як кофактор для багатьох ферментів, включаючи гідратази, дегідрогенази, дегідратази, , мутази, трансферази [224].

Кобальт відіграє важливу роль у багатьох метаболічних процесах та взаємодіє з ключовими біологічно активними речовинами, такими як піридоксин, полісахариди, дегідроаскорбінова кислота, рибофлавін та піридинові нуклеотиди [127]. Як один із вітамінів групи В, Вітамін B_{12} (кобаламін) є критично важливим для клітинного метаболізму, зокрема для синтезу ДНК, еритропоезу та функціонування нервової системи [234]. Відома його участь у синтезі ДНК та мієліну [55]. Метаболічно активними формами кобаламіну є метилкобаламін і 5-дезоксиаденозилкобаламін [133].

У певному діапазоні концентрацій кобальт є критично важливим для росту та кальцифікації фітопланктону [97] і може активувати клітинні процеси фіксації карбону та отримання органічного фосфору [219].

Кобальт рідше виступає в ролі складової металоферментів порівняно з іншими перехідними металами, такими як залізо, мідь, цинк і манган. Проте, на сьогодні ідентифіковано низку ферментів, до складу яких входить кобальт. Серед них слід відзначити метіонінамінопептидазу, нітрилгідратазу, альдегіддекарбонілазу, бромпероксидазу, глюкозоізомеразу, тіоціанатгідролазу та інші [169, 225].

Саме тому, що більшість кобальтвмісних ферментів каталізують унікальні біохімічні реакції, вони є надзвичайно важливими як у медичній, так і в промисловій сферах. Іони металів, такі як Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} і Zn^{2+} , що входять до складу ферментів, можуть бути замінені на іони Co^{2+} .

Сучасні дослідження розширюють наше розуміння біологічних функцій кобальту, особливо щодо його впливу на реакцію клітин риб на дефіцит кисню (гіпоксію). Кобальт здатен стабілізувати фактор, індукований гіпоксією (HIF), який є активатором транскрипції. Таким чином, він імітує стан гіпоксії та індукує продукування еритропоєтину. Ймовірно, за допомогою цього ж механізму кобальт стимулює скоординовану регуляцію цілого ряду адаптивних реакцій організму. З іншого боку, це відкриває можливість позитивного впливу кобальту в умовах кисневого голодування тканин і, можливо, розглядає його як потенційну альтернативу гіпоксичному прекондиціонуванню [239].

Хоча для рослин кобальт не є життєво необхідним елементом, він відіграє значну роль у харчуванні тварин. Зокрема, спостерігається позитивний зв'язок між концентрацією кобальту та рівнем вітаміну B^{12} у печінці жуйних тварин [189]. Недостатня кількість кобальту в кормах може спричинити захворювання жуйних тварин, пов'язані з їхнім харчуванням [24].

Нестача цього металу може викликати порушення росту та розвитку риб [197]. Вони потребують надходження вітаміну B_{12} з їжею, оскільки мікрофлора їхнього травного тракту не може синтезувати цей вітамін у достатній кількості. У деяких видів риб синтез вітаміну B_{12} відбувається у кишківнику мікроорганізмами, що забезпечує потреби в цьому вітаміні для

нільської та гібридної тілапій, але цього недостатньо для каналного сома. Орієнтовна потреба в кобальті з кормом для *Tilapia zillii* становила близько 100 мг металу на кілограм корму. Водночас, нижча концентрація кобальту (10 мг/кг) у раціоні стимулювала синтез вітаміну B₁₂ шлунково-кишковими бактеріями у окуня та задовільняла його потребу в цьому вітаміні [133, 138].

Описані численні моделі дефіциту вітаміну B₁₂ у ссавців [141], на рибах досліджені недостатньо. Зокрема, дефіцит кобаламіну (вітаміну B₁₂) в організмі риб данію реріо проявлялася руховими порушеннями, погіршенням пам'яті, підвищеною дратівливістю, проблемами з рівновагою та когнітивними розладами [55]. Це часто асоціювалося зі збільшенням анемії, а також змінами в центральній або периферичній нервовій системі [60, 74, 201, 233].

У дослідженні [141] було розроблено модель дефіциту вітаміну B₁₂ у рибок данію шляхом блокування транспортного механізму, необхідного для засвоєння цієї сполуки. Риби данію з гомозиготними нульовими алелями в гені *mtashc* (що відповідає за внутрішньоклітинну обробку та транспортування кобаламіну) виживали під час ембріонального розвитку, але гинули до настання статевої зрілості. Крім того, у них спостерігалися значні порушення росту та підвищений рівень метилмалонової кислоти й загального 2-метилцитрату, що свідчило про розвиток метилмалонової ацидемії. В іншому експерименті було виявлено, що риби данію можуть доживати до дорослого віку, демонструючи нормальний фенотип, але при цьому проявляють характерні ознаки дефіциту вітаміну кобаламіну та порушення росту, що узгоджуються з результатами попередніх досліджень [141].

Окрім порушень росту та метаболізму, подальші дослідження на рибах виявили серйозні дефекти репродуктивної системи. Це призводило до значних аномалій ембріонального розвитку та підвищених рівнів метаболітів, що асоціюються з дефіцитом вітаміну B₁₂ [141].

Кобальт є життєво важливим мікроелементом, що необхідний для росту та функціонування клітин, регенерації еритроцитів та продукування

енергії. [214, 243, 121]. Результати досліджень продемонстрували, що найвищий відсоток рухливих сперматозоїдів та найбільша тривалість їхньої активності у *Salmo coruhensis* спостерігалися при концентрації кобальту, що становила 100 мг/дм³ [127].

Автори [233] показали, що вітамін B₁₂ може відігравати позитивну роль у відновленні нормальної поведінки рибок даніо після їхнього контакту із сумішшю пестицидів. Вважається, що це відбувається завдяки його взаємодії з ферментами антиоксидантної системи організму риб. Результати досліджень також підтверджують, що додавання кобаламіну до раціону даніо призводило до покращення показників рухової активності цих риб.

1.5. Токсичність кобальту для гідробіонтів

Промисловий розвиток виробництва призвів до зростання антропогенного навантаження на іхтіоценози, зокрема через надходження хімічних стоків, що містять метали, у гідроекосистеми. Сполуки важких металів відіграють важливе значення в екотоксикології риб через їх стійкість та здатність до акумулювання в організмі [105].

Токсичність характеризує здатність полютанта негативно впливати на ріст, виживання та репродуктивну функцію. Механізм дії важких металів на біоту є надзвичайно складним, і деякі аспекти цих процесів залишаються до кінця не з'ясованими. Рівень накопичення важких металів у живих організмах визначається співвідношенням швидкості їх надходження в організм та швидкості їх виведення [158].

У водному середовищі метали можуть перебувати в розчиненому стані, адсорбуватися на завислих частинках або накопичуватися в донних відкладах, звідки вони можуть повторно потрапляти у водну товщу і включатися до харчових ланцюгів. Як правило, іонні форми важких металів є токсичнішими, ніж складні неорганічні або органічні комплекси. У прісній воді низький рН часто збільшує концентрацію вільних іонів металів, що відповідно підвищує їхню токсичність. Натомість, зростання лужності та концентрації неорганічних аніонів, які мають здатність утворювати комплексні іони

металів, сприяє зниженню токсичності [121]. Розчинені форми металів характеризуються високою біодоступністю, що зумовлює їхню інтенсивнішу акумуляцію у водних організмах [226].

Методології, що використовуються для оцінки впливу хімічних забруднювачів у водних екосистемах, базуються на трьох ключових характеристиках: стійкості, здатності до біонакопичення та токсичності. Особливу небезпеку становлять токсичні речовини, які одночасно є стійкими в навколишньому середовищі та здатними до біоаккумуляції в організмах [213].

З огляду на те, що токсичність кобальту значною мірою залежить від рівня його накопичення в тканинах живих організмів, важливим є визначення факторів концентрування кобальту, які представляють собою відношення концентрації металу в організмі до його вмісту у навколишньому водному середовищі. Коефіцієнти акумулювання кобальту для різних видів прісноводних рослин, безхребетних і риб змінюються в межах від 1000 до 10 000. Для морських молюсків ці коефіцієнти можуть сягати тисяч до десятків тисяч, тоді як інші морські бентосні безхребетні концентрують кобальт у межах від 100 до 40 000 [206].

Зазвичай, коефіцієнти концентрації кобальту для морських риб коливалися в межах від 100 до 4000. Морські рослини демонстрували значно вищі показники, з діапазоном від тисяч до десятків тисяч. Прісноводні риби, як правило, мали коефіцієнти концентрування від 10 до 1000, тоді як у безхребетних цей діапазон був набагато ширшим – від 1 до 100 000. Найвищі коефіцієнти накопичення кобальту спостерігалися у прісноводних водоростей, які могли концентрувати цей метал у діапазоні від 400 до приблизно 2 мільйонів разів порівняно з його вмістом у воді [206].

Автори [239] здійснили аналіз літературних даних щодо вмісту кобальту в морських біологічних об'єктах і повідомили про середнє значення, що становить близько 1 мг/кг (міліграм кобальту на кілограм маси тіла).

Токсичний вплив, навіть при підвищених концентраціях есенціальних металів, може проявлятися на всіх рівнях організації живого, включаючи молекулярний, клітинний, тканинний, організмівий та популяційний [211].

Багато ферментів тваринного організму потребують присутності металів для прояву каталітичної активності. Однак, навіть життєво необхідні метали можуть ставати токсичними та становити значну загрозу для здоров'я, якщо їхнє зв'язування в організмі порушується, і вони акумулюються до критично високих концентрацій [121]. Важкі метали чинять безпосередню токсичну дію на водні організми, що проявляється як гостра та хронічна токсичність, а також у надмірному накопиченні в їхніх органах і тканинах [101].

Важкі метали можуть стимулювати утворення активних форм кисню, що призводить до розвитку окислювального стресу в організмі. Окислювальний стрес, своєю чергою, може спричиняти цілий ряд захворювань та аномальних станів у гідробіонтів [213].

Токсичність та потенційний негативний вплив кобальту на гідробіонтів часто залишаються поза належною увагою через його, як правило, низькі концентрації у навколишньому середовищі [135]. У порівнянні з впливом іонів інших металів, особливо при короткочасному впливі, токсичність кобальту для риб є відносно невисокою [64].

Концентрації кобальту у природних водних екосистемах часто є нижчими за летальні рівні для багатьох видів прісноводних кісткових риб. Проте, навіть відносно низькі концентрації можуть бути токсичними для деяких чутливих видів. Наприклад, для лососевих риб токсичні дози становили 0,02 мг/л для *Oncorhynchus tshawytscha* та 0,2 мг/л для *Oncorhynchus mykiss*. 96-годинний LC50 для райдужної форелі був у діапазоні 0,4–1,4 мг/л [127, 221,].

Аналізуючи наявні наукові публікації, можна дійти висновку, що райдужна форель (*Oncorhynchus mykiss*) є одним із найбільш чутливих видів риб до отруєння кобальтом. Значення LC50 (концентрація, що викликає загибель 50% досліджуваної популяції) для *O. mykiss* становили 470–490 мкг/л

при 28-денних експериментах та 520 мкг/л при 144-годинному тестуванні з використанням молодих особин. Ефективні концентрації кобальту, що викликали токсичні ефекти при гострих (96-годинних) тестах на райдужній форелі, починалися від 1406 мкг/л [21].

Для дослідження впливу сублетальних концентрацій кобальту також використовували *Carassius auratus* та *Pimephales promelas*. За даними Birge (1978), семиденна ембріонально-личинкова LC50 для *C. auratus* становила 810 мкг/л, тоді як 96-годинна LC50 для молодих особин *P. promelas* була значно вищою – 3610 мкг/л. Слід зазначити, що кобальт є гостро токсичним у великих дозах. Дослідження *in vitro* на клітинних культурах ссавців показали, що іони кобальту є цитотоксичними, індукуючи апоптоз (програмовану клітинну смерть), а при ще вищих концентраціях – некроз, що супроводжується запальною реакцією. Крім того, солі кобальту виявляють генотоксичність, спричиняючи окисне пошкодження ДНК та впливаючи на системи метилювання та відновлення ДНК [214].

Частина токсичних ефектів іонів Co^{2+} пов'язана з пригніченням транспорту іонів Ca^{2+} , порушенням Ca^{2+} –сигнальних шляхів та конкуренцією з Ca^{2+} за внутрішньоклітинні кальційзв'язувальні білки. На клітинній поверхні важливими мішенями дії важких металів є ліпіди біологічних мембран, що призводить до змін їхньої морфології та функціональних властивостей [214].

Між залізом та кобальтом існує гостра біологічна конкуренція, оскільки іони цих металів мають схожі радіуси та однакові біологічно важливі ступені окиснення (+2 та +3) [154].

На відміну від інших металів (свинцю, міді, кадмію та ін.), іони кобальту вирізняються вищою розчинністю в цитозолі легень, плазмі, синовіальній та альвеолярній рідині, сироватці, а також у шлунково-кишковому тракті тварин. При цьому кобальт є імуногенним і здатний спричинити міокардіальну токсичність та значні ушкодження мітохондрій [164].

Експериментально було продемонстровано, що концентрація кобальту 172 мкг/л у водному середовищі призводить до запуску процесу нестатевого розмноження у *Aiptasia pulchella*. [113].

Було доведено, що хронічна експозиція *L. vannamei* до іонів кобальту викликає порушення росту, індукує окислювальний стрес, призводить до пошкодження кишкового епітелію та модулює склад кишкової мікробіоти. [110]. Окрім того, кобальт може впливати на гематологічні показники риб [215] та спричиняти окислювальний стрес [64], апоптоз та аномалії розвитку [223].

Дослідження *in vitro* виявили, що кобальт пошкоджує ДНК та індукує утворення АФК, особливо в присутності перекису водню. Окисно-відновно активні іони кобальту каталізують синтез АФК, а їх токсичність головним чином є наслідком конкуренції з біологічно важливими іонами металів, що порушує функціональність макромолекул [121].

Експериментально було доведено, що хронічна експозиція *Danio rerio* до кобальту індукує пошкодження ДНК сперматозоїдів, спричиняє підвищену експресію генів, залучених до репарації ДНК, у сім'яниках та призводить до зниження репродуктивної функції. [63].

У самців *Danio rerio*, що зазнавали хронічної експозиції до кобальту протягом 12 діб, спостерігалось дозозалежне зростання фрагментації ДНК сперматозоїдів, що корелювало зі зниженням коефіцієнтів запліднення та вилуплення. Після періоду відновлення тривалістю 6 діб було зафіксовано повернення рівня пошкодження ДНК до контрольних значень та активацію експресії генів, залучених до репарації ДНК, у тканині сім'яників [63].

Однак, експозиція сперми до високої концентрації кобальту (1000 мг/л) може призвести до значних адверсних ефектів. Спостережуване інгібування моторики, вірогідно, є наслідком токсичної дії. Високі рівні іонів кобальту негативно корелюють з якістю сперми, викликаючи зниження сперматогенезу та кількості сперматозоїдів, індукуючи значні морфологічні аномалії та дегенеративні процеси [224].

Крім того, акінезія сперматозоїдів, незалежно від цитолізу, може бути опосередкована мітохондріальною дисфункцією, спричиненою впливом кобальту [127].

Кобальт може впливати на поведінку риб, зокрема блокуючи бічну лінію плотви (*Rutilus rutilus*). Це порушує їхню здатність реагувати на рухи здобичі, що потенційно знижує їхню здатність уникати хижаків або ефективно шукати їжу. [49].

У дослідженні [200] показано, що дія наночастинок кобальту призводить до скорочення м'язового сегмента та розвитку патологічних процесів у м'язовій тканині, включаючи дезорганізацію волокон, їх розрив та розростання фіброзної тканини. У рибок данію, які зазнавали впливу наночастинок кобальту, спостерігалось зменшення розміру м'язових пучків, площі м'язів, щільності м'язових волокон та збільшення міжволоконного простору, а також значні травматичні зміни. Вважається, що наночастинки кобальту запускають окислювальний стрес та апоптоз, що в свою чергу призводить до зниження експресії генів, відповідальних за розвиток м'язів, та подальшого пошкодження м'язової тканини. [200].

Отже, прояви токсичності кобальту на рівні окремих організмів та популяцій риб є функцією інтенсивності та тривалості експозиції, а також видової специфічності гідробіонтів. На сьогоднішній день механізми дії даного металу на риб залишаються не до кінця розкритими, що зумовлює необхідність проведення подальших досліджень у цій галузі.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Умови утримання риб та відбір зразків тканин

Для експериментальних досліджень було використано поширені прісноводні види риб карась сріблястий (*Carassius gibelio* Bloch.) і щука звичайна (*Esox lucius* L.) із середньою масою 200—220 г та 150—170 г відповідно. Вивчали вплив кобальту у двох концентраціях – 2 і 5 ГДК, що в перерахунку на іони становило 0,1 та 0,25 мг/дм³.

Такі концентрації іонів металу у воді є такими, що переважно використовуються під час досліджень водних інтоксикацій та викликають формування в організмі риб адаптивної реакції на стрес-чинник [31, 215]. Використання менших концентрацій є недоцільним через відсутність ефекту їх впливу на біохімічні показники як у гострому, так і в хронічному експерименті.

Метал додавали у воду акваріумів об'ємом 200 дм³, де знаходилися дослідні групи риб (по п'ять особин у кожному), у вигляді хлориду кобальту ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). У акваріумах, де знаходилися риби, підтримували рівень кисню на рівні 6,5 – 7,5 мг/дм³, вуглекислого газу – 2,1–2,7 мг/дм³, рН – 7,4 – 7,7, загальна твердість – 6,7–6,8 ммоль/дм³, температура води становила 18±2 °С. Воду в дослідних акваріумах змінювали щодоводобово. Тварин під час проведення експерименту не годували. Для досягнення максимального прояву функціонування компенсаторно-адаптивних реакцій до металу аклімацію риб здійснювали протягом 14 діб. Цей період, згідно низки досліджень [162, 215], є достатнім для формування пристосувальних реакцій в організмі холонокровних тварин.

Після зазначеного терміну було визначено розмірні показники риб та їх основні індекси. Морфометричні характеристики риб визначали за стандартними методиками [8]. Для гематологічних досліджень відбирали голкою кров із серця риб. Для запобігання зсіданню крові використовували гепарин. Для одержання плазми кров центрифугували 15-20 хвилин за 2500 об/хв.

Відбір тканини печінки, зябер та білих м'язів спини здійснювали за температури 4°C, після чого їх гомогенізували [9].

Для з'ясування відкликів системи крові на стрес чинник визначали кількість еритроцитів, гемоглобіну, гематокрит, концентрацію кобальту, лактату та пірувату, глюкози, протеїнів, продуктів ПОЛ в крові, а також активність лактатдегідрогенази каталази та супероксидисмутази у плазмі крові риб. Також було проведено електрофоретичне розділення білків плазми крові.

У гомогенатах тканин визначали вміст кобальту, активність ферментів енергетичного обміну (лактатдегідрогеназа, сукцинатдегідрогеназа та цитохромоксидаза) і трансамінування (аспартат- та аланінамінотрансферази)

Схема експериментальних досліджень представлена на рис. 2.1

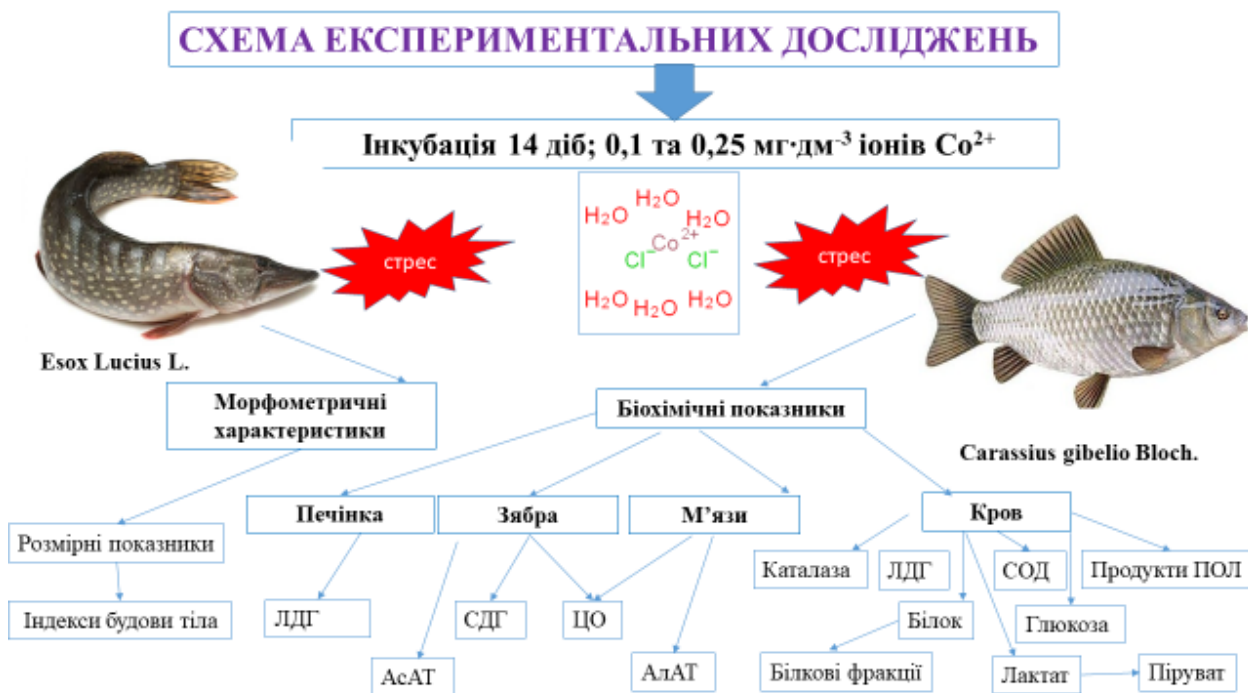


Рис. 2.1. Схема проведення експериментів

Експерименти на прісноводних рибах проводили відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для польових та лабораторних експериментів (Страсбург, 1986), ухвали Першого національного конгресу з біоетики [10] та рішення етичної комісії Тернопільського національного педагогічного університету (Протокол № 2/2020, від 3 серпня 2020 р.). Усі використані реактиви мали кваліфікацію «осч» або «хч».

2.2. Визначення вмісту металів у тканинах риб

Для визначення вмісту металу проби крові та тканин спалювали у концентрованій нітратній кислоті у співвідношенні 1:5 (об'єм : об'єм) в тефлонових герметичних колбах за температури 110-120° протягом двох годин. Вміст металу визначали на оптичному спектрометрі з індуктивно-зв'язаною плазмою «iCAP 6300 DUO» (США) та виражали в мг/л крові або мг/кг вологої тканини.

2.3. Біохімічні методи дослідження

2.3.2. Дослідження загальних показників крові

Еритроцити та гематокрит. Підрахунок еритроцитів проводили в камері Горяєва [48]. Пробу крові набирали меланжером до позначки 0,5, після чого розводили фізіологічним розчином до мітки 101, досягаючи таким чином 200-кратного розведення. За допомогою скляної палички наносили 1-2 краплі розведеної крові на камеру Горяєва, заповнюючи її під покривним склом. Через хвилину проводили підрахунок еритроцитів у 5 великих або 80 малих квадратах, розташованих по діагоналі сітки. При цьому враховували клітини, що знаходилися всередині малих квадратів, а також ті, що частково лежали на їхніх лівій та верхній межах. Кількість еритроцитів у 1 мкл крові розраховували за формулою:

$$X = \frac{a \cdot 200 \cdot 4000}{80}, \text{ де}$$

X – кількість еритроцитів у 1 мкл крові;

a – кількість еритроцитів у 80 малих квадратах;

80 – кількість малих квадратів;

200 – розведення крові;

4000 – множник, який приводить результат до об'єму 1 мкл крові.

Гематокритне число (відношення об'єму еритроцитів до загального об'єму крові) визначали за допомогою мікрокапілярів попередньо оброблених розчином гепарину та висушених при кімнатній температурі. Кров набирали у підготовлені капіляри. Кінець капіляра закупорювали замазкою, після чого

їх центрифугували 10 хвилин при 2000 об/хв, доки об'єм еритроцитів не ставав постійним. Об'єм еритроцитів і сироватки вимірювали міліметровою лінійкою. Відсоткове співвідношення висоти стовпчика еритроцитів до загальної висоти стовпа крові і є гематокритом [48].

Гемоглобін. Кількість гемоглобіну визначали ціанметгемоглобіновим методом [77]. Для цього до 5 мл розчину Драбкіна додавали 20 мкл цільної крові. Суміш ретельно перемішували та витримували 20 хвилин у холодильнику. Потім вимірювали оптичну густину отриманого розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм, використовуючи розчин Драбкіна як контроль.

Глюкоза. Кількісне визначення глюкози в плазмі крові риб проводили за допомогою глюкозооксидазного методу з використанням комерційного набору реактивів Глюкоза-200 [59]. В основі цього методу лежить специфічна ферментативна реакція, в якій глюкозооксидаза каталізує окиснення глюкози до глюконової кислоти та перекису водню. Утворений перекис водню, у свою чергу, вступає в реакцію окиснення з хромогеном, що призводить до формування забарвленої сполуки. Інтенсивність отриманого забарвлення є прямо пропорційною початковій концентрації глюкози в аналізованій пробі плазми крові. Аналіз проводили шляхом додавання 0,04 мг гомогенату плазми (або еквівалентного об'єму дистильованої води для контролю) до 4 мл субстратно-буферного розчину. Цей розчин містив 4.4 одиниці пероксидази, 36 одиниць β -D-глюкозооксидази, 0,22 мг 4-амінофеназону та 0,38 мг фенолу в 2 мл 0,1 М фосфатного буферу з рН 7,2-7,4. Реакційну суміш інкубували протягом 20 хвилин при температурі 25°C, після чого вимірювали її оптичну щільність на спектрофотометрі при довжині хвилі 530 нм.

Піруват та лактат. Екстракцію пірувату та лактату з проб крові риб здійснювали за допомогою обробки крижаним розчином 6% хлорної кислоти. Подальше кількісне визначення зазначених сполук проводили ферментативним методом, використовуючи лактатдегідрогеназу після попередньої нейтралізації екстракту [73].

Загальний білок. Вміст білка в плазмі крові визначали за Лоурі та співавт [182]. В основі методу лежить утворення забарвлених продуктів, що виникають в результаті взаємодії ароматичних амінокислот з реактивом Фоліна, яка відбувається одночасно з біуретовою реакцією.

Фракційний склад білків плазми крові. Для дослідження білкових фракцій сироватки крові риб застосовували електрофорез на приладі FORESCAN 001 (Китай). По завершенні електрофоретичного розділення, пластинки піддавали фіксації в розчині етанолу з оцтовою кислотою протягом 15 хвилин, після чого їх висушували. Фарбування білків здійснювали шляхом занурення пластинок на 10 хвилин у розчин амід-чорного. Надлишок барвника видаляли у трьох послідовних ваннах. Після промивання дистильованою водою пластинки висушували в потоці теплого повітря (80°C). Кількісний аналіз розділених білкових фракцій проводили за допомогою денситометра тієї ж фірми FORESCAN.

Було ідентифіковано такі фракції білків сироватки крові риб: альбумін, α_1 , α_2 , β та γ -глобуліни.

Отримані результати піддавали статистичному аналізу з використанням пакету «Microsoft Excel».

2.3.3. Продукти перекисного окиснення ліпідів

Дієнові кон'югати. Для визначення вмісту дієнових кон'югатів до 0,2 мл крові додавали 1,8 мл суміші н-гептану та ізопропілового спирту у співвідношенні 1:1, струшували і залишали в закритих пробірках на 15 хв, після чого центрифугували при 6000 об/хв протягом 10 хв. Надосад відбирали у пробірки, в які попередньо вносили по 2 краплі води. Одержану гептанову фракцію в кількості 0,5 мл змішували з 2,0 мл етанолу і вимірювали абсорбцію при $\lambda = 233$ нм проти контролю, що містив 0,5 мл нормального гептану і 2,0 мл етанолу. Концентрацію дієнових кон'югатів у крові визначали, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції $103 \text{ мкмоль}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1}$ і виражали в нмоль/г тканини [13].

Гідроперокси́ди ліпідів. Для визначення гідропероксидів ліпідів у крові спочатку осаджували білки трихлороцтовою кислотою з додаванням амоній тіоціанату [13]. До 0,2 мл зразка додавали 2,8 мл етанолу та 0,05 мл 50% ТХО, перемішували та центрифугували. Потім 1,5 мл супернатанту змішували з 1,2 мл етанолу, додавали 0,02 мл HCl, 0,03 мл 1% солі Мора, перемішували і через 30 секунд вносили 0,2 мл 20% тіоціанату амонію. Після 10 хвилин інкубації вимірювали оптичну густину отриманого розчину на спектрофотометрі при 480 нм.

$$\Delta D_{480} (\text{ГПЛ}) = D_{480} (\text{Д}) - D_{480} (\text{К})$$

ТБК-активні продукти. Концентрацію ТБК-активних продуктів у крові вимірювали за допомогою кольорової реакції малонового діальдегіду (МДА) з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) за умов високої температури і кислого середовища, що приводило до утворення триметинового комплексу, який містив одну молекулу МДА і дві молекули ТБК [170]. Для осадження протеїнів до 1 мл крові додавали 4,5 мл 20%-ої фосфорновольфрамової кислоти і осад, що утворився, центрифугували при 2500 об/хв протягом 15 хвилин. Надосадову рідину зливали, а до осаду додавали 1,0 мл 0,8%-го розчину ТБК і витримували протягом 1 год на водяній бані за температури 100°C. Після цього проби охолоджували і центрифугували протягом 10 хв при 6000 об/хв. Спектрофотометричне визначення оптичної густини одержаного центрифугату проводили на довжинах хвиль 532 та 580 нм, використовуючи контрольний зразок, що містив бідистильовану воду замість біологічного матеріалу. Застосування подвійного хвильового сканування абсорбції дозволило елімінувати внесок у поглинання забарвлених комплексів, утворених неліпідними сполуками, забезпечуючи таким чином специфічне визначення ТБК-реактивних речовин. Концентрацію ТБК-активних продуктів у зразку виражали в нмоль МДА на мл крові, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції утвореного комплексу, який дорівнює 0,156 мкмоль⁻¹·мл⁻¹:

$$C = 0,21 + 26,5 \times \Delta D, \text{ де}$$

C – концентрація ТБК-активних продуктів;

ΔD – оптична густина Д535–Д580.

2.3.4. Дослідження ферментів антиоксидантного захисту

Супероксиддисмутаза. Активність супероксиддисмутази в крові визначали за методом, принцип якого базується на відновленні нітротетразолію супероксидними радикалами, що утворюються в реакції між феназинметасульфатом та відновленою формою нікотинамідаденіндинуклеотиду (NADH) [155]. Утворення нітроформазану, продукту відновлення нітротетразолію, блокується СОД. Для усунення впливу гемоглобіну до 0,2 мл крові додавали 0,5 мл етанолу і 0,3 мл хлороформу, інтенсивно перемішували та центрифугували протягом 15 хвилин при 7000 об/хв. Далі до 0,1 мл супернатанту додавали 0,1 мл 1мкМ розчину ЕДТА, 0,1 мл 1,8 мкМ розчину феназинметасульфату, 0,1 мл 0,4 мкМ розчину нітротетразолію синього і 0,1 мл 1,0 мМ розчину NADH. Загальний об'єм суміші доводили 0,15 М фосфатним буфером (рН 7,8) до 3,0 мл та інкубували за кімнатної температури у темному місці впродовж 30 хв, після чого при довжині хвилі 540 нм вимірювали оптичну густина. Активність визначали за формулою:

$$A = \frac{\Delta D_k - \Delta D_d}{a} P$$

A – активність СОД в у.од./мг білка;

D_k – екстинція контрольного зразка;

D_d – екстинція дослідного зразка;

a – маса протеїну в 0,1 мл досліджуваної рідини;

P – розведення.

Каталаза. Активність каталази визначали за допомогою здатності H_2O_2 утворювати із молібдатами стійкий кольоровий комплекс жовтого кольору [104]. Реакцію запускали додаванням 0,1 мл еритроцитів крові до 2 мл 0,03% гідроген пероксиду. У холостий зразок вносили 0,1 мл дистильованої води. Реакцію зупиняли через 10 хв додаванням 1,0 мл 4%-го амоній молібдату та

через 5 хв в пробірку вносили 0,5 мл 30% трихллооцтової кислоти. Інтенсивність забарвлення вимірювали при довжині хвилі 410 нм проти контрольного зразка, у який замість розчину гідроген пероксиду додавали 2,0 мл дистильованої води.

Результати визначали за формулою:

$$A = \frac{\Delta D_{хол} - \Delta D_{дос}}{t \cdot V \cdot K \cdot a} P$$

де

A – активність каталази в мкмоль

H₂O₂/мг протеїну за 1 хв;

D_{хол} – екстинція холостого зразка;

D_{дос} – екстинція дослідного зразка;

V – об'єм зразка, мл;

t – час інкубації, хв;

K – коефіцієнт мілімолярної екстинції H₂O₂, що дорівнює 22,2·10³ мМ⁻¹·см⁻¹;

a – кількість білка, мг/мл досліджуваної рідини;

P – розведення.

2.3.5. Дослідження ензимів енергетичного обміну та переамінування

Лактатдегідрогеназа. Активність лактатдегідрогенази (КФ 1.1.1.27) визначали за інтенсивністю окиснення НАДН. Реакцію проводили у К-фосфатному буфері рН 7,4 у присутності натрій пірувату за довжини хвилі 340 нм. Процедура визначення активності ензиму включала приготування інкубаційного середовища, що складалося з 3 мл трис-НСІ буферного розчину, певної кількості пірувату та 0,05 мл розчину відновленого НАДН з концентрацією 9·10⁻³ М. До цієї суміші додавали 0,05 мл плазми крові чи гомогенату тканини, в якому містилося від 20 до 40 мікрограмів білка, після чого вміст кювети інтенсивно перемішували. Зміну оптичної густини реєстрували протягом однієї хвилини за допомогою спектрофотометра

UIT SFU-0172 (Китай). Активність ферменту кількісно визначали як кількість мікромолів окисленого НАДН за одну хвилину на один міліграм білка, використовуючи рівняння:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V \cdot K}{6,22 \cdot a}, \text{ де}$$

A – активність ЛДГ, мкмоль НАДН/хв на 1 мг білка

ΔE – зміна оптичної густини проби в ході ферментативної реакції за 1 хв;

V – кінцевий об'єм проби в кюветі;

6,22 – коефіцієнт мікромолярної екстинції піридинових нуклеотидів при 340 нм [41, 230].

Сукцинатдегідрогеназа. Активність сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.99.1) визначали фериціанідним методом [7]. Принцип методу оснований на окисленні сукцинату до фумарату калій гексаціанофератом (III) під дією СДГ. Інкубаційна суміш при цьому містила: 0,1 М фосфатний буфер (рН 7,8), 0,1 М бурштинову кислоту, 0,025 М ЕДТА, 25 мМ $K_3Fe(CN)_6$. Реакцію зупиняли додаванням 10 % трихлороцтової кислоти. Спектрофотометрію здійснювали при довжині хвилі 420 нм. Розрахунок активності ензиму проводили за формулою:

$$A = \frac{m \cdot 1000}{M \cdot a \cdot t \cdot 2}, \text{ де}$$

A – активність сукцинатдегідрогенази нмоль/1 мг білка за 1 хв

m – кількість відновленого фериціаніду у пробі, мкг;

a – вміст білка, мг;

M – молекулярна маса $K_3[Fe(CN)_6]$;

t – час, хв;

2 – 1 моль сукцинату відновлює 2 моль фериціанату.

Цитохромоксидаза. Активність ферменту визначали за Штраусом [212]. Метод базується на тому, що за дії цитохромоксидази проходить конденсація α -нафтолу і парафенілендіамінгідрохлориду з утворенням індофенолового синього. Суміш для інкубації містила: 0,2 М фосфатний

буфер (рН 7,8), 0,1% α -нафтол, 0,1 % парафенілендіамінгідрохлорид та 0,02 % цитохром *c*. Час інкубації становив 20 хв. Реакцію зупиняли додаванням спиртово-ефірної суміші (1:10), після чого 20 хв струшували і проводили вимірювання оптичної густини при довжині хвилі 540 нм. Результати виражали в мкг індофенолового синього на мг білка за 20 хв.

Амінотрансферази. Активність аспартат- та аланінамінотрансферази (К.Ф. 2.6.1.1 і 2.6.1.2) в гомогенатах тканин та сироватці крові визначали колориметрично за Рейтманом і Франкелем [188]. Інкубаційна суміш містила 0,1 М калій-фосфатний буфер (рН = 7,4); 200 мМ DL-аланіну або DL-аспартату; 2 мМ α -кетоглутарату. До 1 мл суміші додавали 0,2 мл субстрату та інкубували 30 хвилин за температури 37 °С після чого реакцію зупиняли додаванням 2,4-динітрофенілгіدразином. Гідразони кетокислот після інкубації екстрагували водонасиченим толуолом і фотометрували при 420 нм. Активність ферментів виражали в мкмоль пірувату на мг білку за годину або мкмоль пірувату на мл плазми крові за годину.

2.4. Статистичні методи обробки результатів дослідження

Результати досліджень подані у вигляді $M \pm m$. Якщо дані не були нормально розподілені, до їх статистичного аналізу були застосовані непараметричні тести (Kruskall–Wallis ANOVA та Mann–Whitney *U*-test) при вірогідності за значення $p < 0.05$. Вірогідність відхилення двох рядів значень обчислювали з використання *t*-тесту Стюдента. Достовірними вважали відмінність між вибірками за $p < 0,05$. Відповідність між двома рядами значень встановлювали за обчисленням коефіцієнту кореляції Пірсона.

Оцінку взаємозв'язків між показниками риб здійснювали за допомогою факторного аналізу. Для статистичної обробки результатів використовуючи комп'ютерні програми Statistica v 12.0 та Exel для Windows-2016.

РОЗДІЛ III. ВПЛИВ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ІОНІВ Co^{2+} НА МОРФОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ РИБ

Вагові та лінійні параметри риб, а також їхні взаємозв'язки, є значущими показниками, що можуть свідчити про фізіологічний стан особин та екологічні умови у водному середовищі [91].

Тому у цьому розділі роботи в модельних умовах було досліджено морфометричні показники карася сріблястого і щуки звичайної за дії сублетальних концентрацій іонів Co^{2+} .

Фізичні параметри риб, їхня морфологія, впливають на важливі фізіологічні функції (наприклад, респірацію та розвиток) і відіграють вирішальну роль у тому, як водні організми адаптуються та взаємодіють з середовищем існування. [162]. Розмірні характеристики цих об'єктів можуть варіюватися залежно від водного середовища і, як наслідок, відображати рівень його забруднення, у тому числі металами. Насамперед, це викликано змінами в харчовій поведінці, гормональними розладами у риб та мобілізацією їхніх пластичних резервів на потреби, пов'язані з регуляцією надходження, зв'язування та виведення металів [119].

3.1. Морфологічні показники карася за дії іонів кобальту

Результати морфометричних вимірювань карасів показали, що за більшістю параметрів вони не відрізнялися від контрольної групи (табл. 3.1). Водночас, дія іонів кобальту у концентрації $0,1 \text{ мг/дм}^3$ призвела до статистично вірогідного зменшення таких показників, як постдорсальна відстань, довжина хвостового стебла та висота спинного плавця. Важливо зауважити, що деформації плавців або зміна обрисів тіла, викликані отруєнням металами, можуть погіршити плавання, ефективність живлення та здатність рятуватися від хижаків [235].

Вплив $0,25 \text{ мг/дм}^3$ іонів Co^{2+} спричинив у риб зменшення таких морфометричних показників, як вентроанальна відстань, висота лоба та спинного плавця, одночасно збільшивши довжину черевного та основи анального плавця. Крім того, дія сублетальних концентрацій іонів кобальту

вказувала на тенденцію до зменшення маси печінки та призвела до вірогідного зменшення маси нирок у карася при концентрації 0,25 мг/дм³.

Загалом токсичний вплив металів, і кобальту зокрема, може призвести до ураження внутрішніх органів, таких як печінка та нирки. Ці органи є ключовими для підтримання основного обміну речовин, а також виконують головну функцію накопичення, трансформації та виведення шкідливих речовин у риб [217].

Таблиця 3.1

Розмірні показники карася за дії сублетальних концентрацій іонів Co²⁺
(M±m, n=7)

Морфометричні показники	Контроль	0,1 мг/дм ³	0,25 мг/дм ³
L – абсолютна, або зоологічна довжина /ab/	26,12±0,40	25,00±0,54	25,10±0,36
l –ad/ – відстань від вершини рила до кінця лускового покриву	21,10±0,28	21,78±0,61	20,63±0,21
lcor – довжина тулуба (od)	16,17±0,10	15,48±0,41	16,10±0,19
1r – довжину рила (an)	1,73±0,08	1,60±0,06	1,70±0,04
do – діаметр ока (np).	0,83±0,02	0,83±0,03	0,85±0,03
po – позаочний простір (po)	3,03±0,13	2,95±0,06	3,00±0,04
ho – висоту лоба (ln ₁)	1,18±0,06	0,98±0,05	0,95±0,03*
io – ширина лоба (інтерорбітальна відстань)(n ₁ n ₂)	2,60±0,08	2,50±0,06	2,45±0,06
mx – довжина верхньої щелепи (aa ₂)	1,53±0,06	1,50±0,04	1,38±0,02*
mn – довжину нижньої щелепи (kk ₁)	1,15±0,03	1,13±0,02	1,15±0,03
1c – довжина голови (ao)	5,63±0,13	5,28±0,10	5,18±0,16
H – найбільша висота тіла (gg)	8,58±0,29	8,48±0,25	8,68±0,25
h – найменша висота тіла, або висота хвостового стебла (ii ₁).	3,38±0,09	3,35±0,06	3,40±0,06
ad – антедорсальна відстань (aq)	10,23±0,23	10,38±0,16	10,23±0,25
pD – постдорсальна відстань (rd)	4,01±0,04	3,63±0,08*	3,80±0,11
pl – довжина хвостового стебла (fd)	3,53±0,7	3,28±0,06*	3,30±0,08
aP – антепектральна відстань (av)	5,97±0,15	5,70±0,08	5,58±0,07
av – антевентральна відстань (az)	10,20±0,24	9,93±0,23	10,05±0,04
aA – антеанальна відстань (ay)	15,80±0,4	15,60±0,47	15,78±0,13

ID – довжину основи спинного плавця (qs)	7,90±0,12	7,75±0,26	8,05±0,03
hD – висота спинного плавця (tt ₁)	3,90±0,12	3,38±0,10*	3,38±0,06*
1A – довжина основи анального плавця (yy ₁)	2,35±0,04	2,48±0,06	2,55±0,02*
hA – висота анального плавця (jj ₁)	3,08±0,03	2,93±0,13	3,18±0,07
IP – довжина грудного плавця (vv ₁)	3,60±0,10	3,53±0,04	3,58±0,02
IV – довжина черевного плавця (zz ₁)	3,80±0,06	4,12±0,10	4,12±0,06*
PV – пектровентральна відстань (vz)	4,50±0,10	4,56±0,15	4,28±0,03
VA – вентроанальна відстань (zy)	6,70±0,04	6,38±0,21	6,15±0,06*
IC₁ – довжина верхньої лопаті хвост. плавця (d ₁ b ₁)	5,33±0,10	5,15±0,13	5,28±0,12
1C₂ – довжина нижньої лопаті хвост. плавця (d ₂ b ₂)	5,45±0,09	5,43±0,09	5,47±0,10
iH – найбільшу товщину тіла	4,00±0,06	3,85±0,10	3,90±0,08
Ccor – охоплення тіла	19,60±0,37	19,78±0,93	20,30±0,43
1.1. – число лусок в бічній лінії	30±1	29±1	29±1
Squ₁ – число лусок над бічною лінією	6±1	6±1	6±1
Squ₂ – число лусок під бічною лінією	6±1	7±1	7±1
Squ pl – число лусок на хвостовому стеблі	8±1	7±1	6±1
Маса риби, г	287,75±13,61	262,50±20,48	271,0±10,26
Маса печінки, г	30,90±0,91	29,13±3,37	27,88±0,94
Маса нирок, г	1,37±0,04	1,39±0,17	1,17±0,04*
Індекс великоголовості	26,4±0,4	24,4±0,4*	25,0±0,7
Індекс прогностичності (високоспинності)	247,3±9,8	257,1±4,7	238,3±5,6
Індекс обхвату (компактності)	92,6±1,9	90,6±2,3	97,8±2,2
Індекс відносної товщини тіла (широкоспинності)	19,0±0,16	17,7±0,3*	18,9±0,3
Коефіцієнт вгодованості за Т. Фультоном	3,05±0,04	2,55±0,14*	2,96±0,08
Індекс печінки риби (печінково-соматичний індекс)	10,8±0,2	10,5±0,6	10,3±0,5

Аналізуючи основні індекси карася, було виявлено зменшення коефіцієнтів великоголовості, широкоспинності та вгодованості у першій дослідній групі риби. Крім того, спостерігалася тенденція до зниження печінково-соматичного індексу зі збільшенням концентрації іонів Co^{2+} у воді, де відбувалася інкубація.

Очевидно, вплив нелетальних концентрацій іонів кобальту викликає фізіологічний стрес у риб. Це, своєю чергою, проявляється у змінах морфологічних характеристик і робить риб вразливішими до хвороб та менш адаптованими до умов навколишнього середовища [23].

3.2. Розмірні характеристики щуки за дії іонів кобальту

Реакція риб на отруйні речовини може варіюватися залежно від концентрації токсину, часу його дії, виду риби та її вікової стадії. Аналогічно до карася, дослідження морфологічних показників щуки не виявили суттєвих відмінностей між групами, що зазнавали впливу токсикантів, та контрольною групою (табл. 3.2).

Водночас, при концентрації іонів кобальту $0,1 \text{ мг/дм}^3$, у щуки спостерігалось зменшення ширини лоба та довжини основи анального плавця. Натомість, при збільшенні концентрації металу до $0,25 \text{ мг/дм}^3$, відзначалося зростання антедорсальної та антепектральної відстаней, а також довжини грудного та черевного плавців. Важливо також зазначити, що на відміну від карася, у щуки зі збільшенням концентрації іонів Co^{2+} у воді спостерігалось збільшення маси печінки.

Таблиця 3.2

Розмірні показники щуки за дії сублетальних концентрацій іонів Co^{2+}
($M \pm m$, $n=7$)

Морфометричні показники	Контроль	$0,1 \text{ мг/дм}^3$	$0,25 \text{ мг/дм}^3$
L – абсолютна, або зоологічна довжина /ab/	$27,30 \pm 0,21$	$27,54 \pm 0,77$	$28,18 \pm 0,46$
l –/ad/) – відстань від вершини риля до кінця лускового покриву	$23,70 \pm 0,21$	$23,88 \pm 0,68$	$24,70 \pm 0,47$
lcor – довжина тулуба (od)	$16,60 \pm 0,28$	$16,56 \pm 0,49$	$17,20 \pm 0,28$
1r – довжину риля (an)	$3,03 \pm 0,16$	$3,14 \pm 0,07$	$3,38 \pm 0,10$
do – діаметр ока (np).	$1,18 \pm 0,02$	$1,12 \pm 0,04$	$1,13 \pm 0,02$
po – позаочний простір (po)	$3,05 \pm 0,18$	$3,30 \pm 0,10$	$3,35 \pm 0,06$
io – ширина лоба, або інтерорбітальна відстань (n_1n_2)	$1,60 \pm 0,02$	$1,50 \pm 0,03^*$	$1,58 \pm 0,02$
mx – довжина верхньої щелепи (aa_2)	$3,35 \pm 0,09$	$3,28 \pm 0,08$	$3,40 \pm 0,04$

mn – довжину нижньої щелепи (kk_1)	3,62±0,08	3,52±0,06	3,66±0,04
1c – довжина голови (ao)	7,45±0,08	7,36±0,18	7,67±0,15
H – найбільша висота тіла (gg)	3,75±0,06	3,6±0,04	3,58±0,03
h – найменша висота тіла, або висота хвостового стебла (ii_1).	1,53±0,02	1,56±0,02	1,56±0,03
ad – антедорсальна відстань (aq)	17,28±0,17	17,50±0,50	18,05±0,20*
pD – постдорсальну відстань (rd)	3,53±0,03	3,44±0,18	3,50±0,07
pl – довжина хвостового стебла (fd)	3,42±0,04	3,36±0,09	3,53±0,04
aP – антепектральна відстань (av)	7,25±0,17	7,38±0,22	8,18±0,10*
av – антевентральна відстань (az)	12,67±0,18	13,00±0,32	13,38±0,39
aA – антеанальна відстань (ay)	18,50±0,23	18,48±0,52	18,90±0,30
ID – довжину основи спинного плавця (qs)	3,25±0,09	3,22±0,10	3,40±0,10
hD – висота спинного плавця (tt_1)	2,90±0,05	3,06±0,02	3,02±0,02
1A – довжина основи анального плавця (yy_1)	2,60±0,06	2,34±0,05*	2,48±0,03
hA – висота анального плавця (jj_1)	2,60±0,03	2,76±0,09	2,75±0,06
IP – довжина грудного плавця (vv_1)	2,80±0,06	2,8±0,07	3,03±0,02*
IV – довжина черевного плавця (zz_1)	2,75±0,08	2,78±0,09	3,00±0,06*
PV – пектровентральна відстань (vz)	5,90±0,17	5,5±0,22	6,00±0,04
VA – вентроанальна відстань (zy)	5,65±0,10	5,48±0,15	5,58±0,07
IC₁ – довжина верхньої лопаті хвост. плавця (d_1b_1)	3,60±0,04	3,54±0,12	3,87±0,12
1C₂ – довжина нижньої лопаті хвост. плавця (d_2b_2)	3,78±0,02	3,72±0,12	3,98±0,12
iH – найбільшу товщину тіла	2,30±0,05	2,26±0,06	2,25±0,03
Ccor – охоплення тіла	10,04±0,19	9,82±0,27	10,00±0,16
Маса, г	104,23±5,56	108,4±6,64	118,50±7,31
Печінка, г	0,88±0,05	1,00±0,08	1,10±0,06*
Індекс великоголовості	31,4±0,4	30,9±0,5	31,1±0,3
Індекс прогностичності (високоспинності)	635,6±11,0	663,0±13,0	685,1±10,6*
Індекс обхвату (компактності)	42,4±0,4	41,2±0,8	40,5±0,7*
Індекс відносної товщини тіла (широкоспинності)	9,8±0,2	9,5±0,2	9,2±0,1*
Коефіцієнт вгодованості за Т. Фультоном	0,81±0,03	0,79±0,02	0,77±0,04
Індекс печінки риб (печінково-соматичний індекс) ПСІ	0,84±0,06	0,95±0,06	0,96±0,10

Вплив нелетальних концентрацій кобальту на щуку призводив до збільшення печінково-соматичного індексу, а також індексів обхвату та прогинності. Разом з тим, коефіцієнти вгодованості та широкоспинності зменшувалися зі зростанням концентрації іонів кобальту у воді, де риби проходили акліматизацію. Можливо, отруєння металом у щуки викликає перерозподіл енергетичних та пластичних резервів між м'язами та печінкою, спрямований на протидію токсичному впливу [38].

Висновки до розділу 3

Таким чином, вплив нелетальних концентрацій іонів кобальту незначно змінює розмірні характеристики риб, що ймовірно пояснюється відносно коротким періодом акліматизації. Однак, зміни основних індексів, особливо печінково-соматичного та вгодованості, мають видові особливості та, у поєднанні з фізіолого-біохімічними показниками, можуть використовуватися для оцінки стану організму риб і рівня забруднення прісних гідроекосистем металами.

РОЗДІЛ IV. ЗМІНИ ГЕМАТОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ РИБ ЗА ДІЇ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ІОНІВ КОБАЛЬТУ У ВОДІ

Зміни якісних і кількісних характеристиках крові є первинною реакцією риб на дію токсикантів, що робить гематологічні показники чутливими індикаторами як фізіологічних змін, так і токсичного впливу. Відповідно, актуальність використання параметрів крові як біомаркерів антропогенного забруднення неодноразово підтверджено науковими дослідженнями. [79, 159, 237].

Кобальт є життєво важливим мікроелементом для всіх хребетних, включаючи риб. Він входить до складу вітаміну B₁₂, який стимулює кровотворення та впливає на ріст риб [49, 122].

Саме тому нами було досліджено вплив іонів Co²⁺ на деякі гематологічні показники в організмі прісноводних риб, а також накопичення цього металу в їх крові за підвищеного його вмісту у воді.

4.1. Вміст кобальту у крові карася та щуки

Аналіз отриманих даних показав, що концентрація металів у крові як карася, так і щуки залишалася майже незмінною під впливом досліджуваних концентрацій іонів кобальту, проте відзначено тенденцію до зниження вмісту кобальту в крові дослідних груп щуки. При цьому важливо зазначити, що у карася рівень металу у цільній крові був приблизно на порядок нижчим, ніж у щуки. (рис. 4.1).

Ймовірно, відсутність акумулювання кобальту у крові риб обумовлене її транспортною функцією у перерозподілі металів. Система крові переносить іони металів від місць їх проникнення або впливу до різних органів і тканин (печінка, нирки, м'язи), де вони можуть асимілюватися або накопичуватися. Разом з тим кров є потенційним інструментом моніторингу забруднення металами. Так, у струмкової форелі (*Salmo trutta fario*) як модельного виду, рівень накопичення металів (Cr, Cu, Se, Zn, As, Cd, Pb) у різних компонентах крові (цільна кров, еритроцити та плазма) був надійним інструментом моніторингу рівня забруднення водного середовища [151].

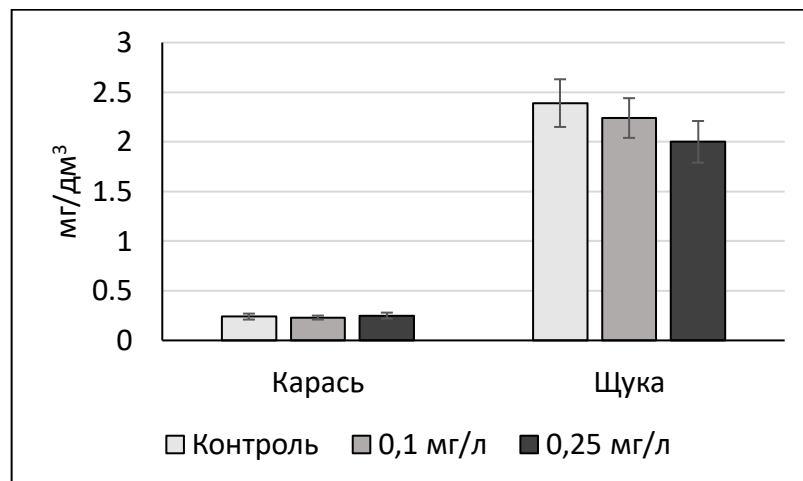


Рис. 4.1. Вміст кобальту у крові риб за дії сублетальних концентрацій кобальту ($M \pm m$, $n=5$). Примітка: * - різниця вірогідна порівняно з контролем ($P < 0,05$)

У дослідженні [45] вказується, що накопичення металів у крові хижих риб *Gadus ogas* та *Myoxocephalus scorpius* може відображати нещодавнє накопичення металів.

4.2. Загальні показники крові риб

Об'єм крові в організмі риб становить у середньому 1-2 % від маси тіла. У кісткових риб цей показник варіюється від 0,9 до 3,7 %, причому у морських риб він становить близько 4,15 %, а у прісноводних – 2,7 % [215].

Дослідження показників крові є цінним інструментом для оцінки загального фізіологічного стану риб, їхньої стійкості та здатності адаптуватися до змін довкілля, включаючи підвищені концентрації іонів металів, що забруднюють водні екосистеми. [66, 156, 209, 238].

Загалом слід відмітити, що зміни хімічного балансу водного середовища обов'язково призводять до змін у складі крові риб, що живуть у цій воді, і це, у свою чергу, відбивається на їх метаболізмі.

Еритроцити. Аналіз крові карасів, що зазнавали впливу іонів Co^{2+} , виявив таку динаміку: за концентрації 0,1 мг/дм³ кількість еритроцитів

зростала на 40% порівняно з контрольною групою (рис. 4.2). Проте, подальше збільшення концентрації іонів металу до 0,25 мг/дм³ призводило до нормалізації кількості еритроцитів та повернення їх кількості до контрольних значень.

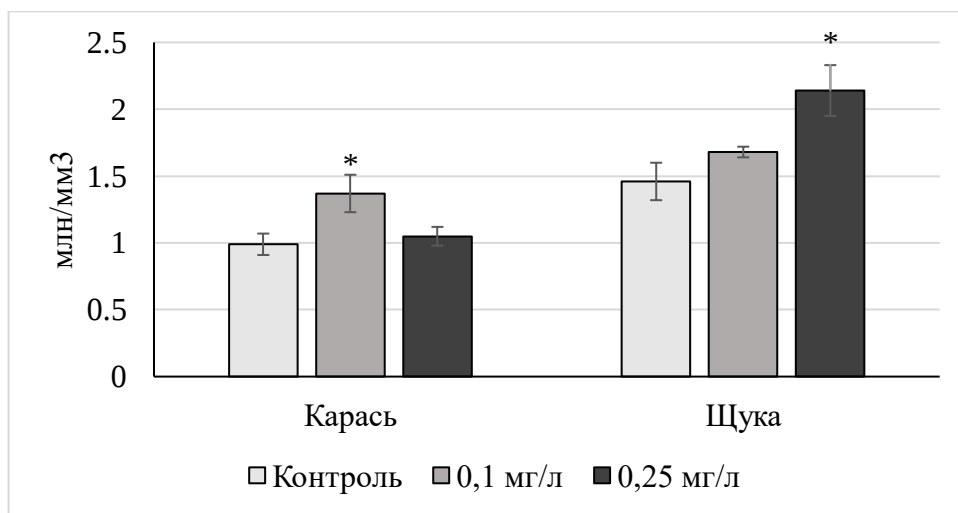


Рис. 4.2. Кількість еритроцитів у крові риб за дії сублетальних концентрацій кобальту, ($M \pm m$, $n=5$)

У щуки спостерігалися відмінні від карася зміни гематологічних показників під впливом досліджуваних концентрацій Co^{2+} , що свідчить про видову специфіку реакції. Статистичний аналіз виявив достовірне зростання кількості еритроцитів у крові щуки в 1,5 рази при дії 0,25 мг/дм³ металу у воді.

Експозиція до кобальту може спричинити значні дисбаланси у співвідношенні клітинних компонентів крові у риб [215]. З однієї сторони дана властивість обумовлена ослизненням епітеліальних структур зябер [232], що зумовлює гіпоксію риб та порушення процесів газообміну в зябровому апараті. Окрім того, акумуляція надлишкових концентрацій кобальту в організмі призводить до порушення регуляції метаболізму та змін гематологічного профілю риб.

Гематокрит. Зміни гематокритного числа у карася під впливом підвищених концентрацій іонів кобальту мали схожу з кількістю еритроцитів тенденцію (рис. 4.3). Так, при концентрації 0,1 мг/дм³ спостерігалось

зростання гематокриту, тоді як при 0,25 мг/дм³ його значення залишалося незмінним. Варто зазначити, що підвищений рівень гематокриту у риб може вказувати на згущення крові внаслідок токсичного стресу, а низький – на анемію, гемоліз або пошкодження зябер [236].

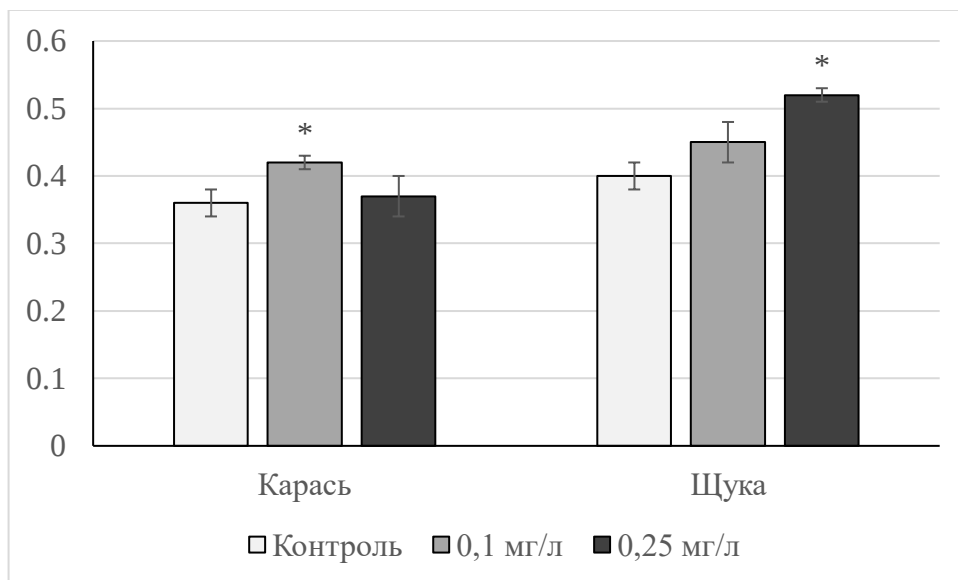


Рис. 4.3. Гематокритне число у крові риб за дії сублетальних концентрацій кобальту, ($M \pm m$, $n=5$)

У крові щуки за 0,25 мг/дм³ іонів Co^{2+} у воді було відмічене достовірне збільшення гематокриту в 1,3 раза. Ймовірно, зростання гематокриту, забезпечує більшу здатність крові транспортувати кисень за інтоксикації металом.

В огляді [27] висвітлюється вплив іонів металів на гемоглобін та гематокрит риб. Автор підкреслює важливість зазначених показників для оцінки рівня забруднення водних екосистем важкими металами, а також звертає увагу на мінливість цих показників залежно від типу та кількості металу, виду риб і параметрів води.

Гемоглобін. Концентрація гемоглобіну у крові риб може змінюватися в доволі широких межах [47].

Результати дослідження виявили збільшення вмісту гемоглобіну в крові карася під впливом обох досліджуваних концентрацій іонів кобальту (рис.

4.4). Однак статистично значущим це зростання виявилось лише при концентрації 0,1 мг/дм³, де рівень гемоглобіну збільшився в 1,35 раза.

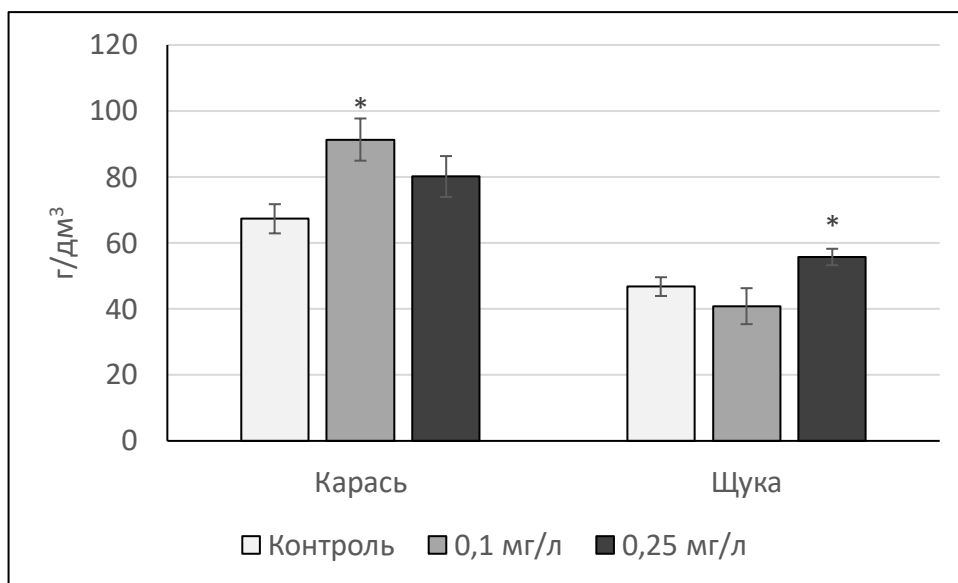


Рис. 4.4. Концентрація гемоглобіну у крові риб за дії сублетальних концентрацій іонів кобальту, ($M \pm m$, $n=5$)

Концентрація гемоглобіну в крові щуки зросла на 19 % під впливом 0,25 мг/дм³ кобальту, тоді як при концентрації 0,1 мг/дм³ відмічалася тенденція до її зниження. Відомо, що в організмі тварин кобальт може активувати іонізацію та резорбцію заліза, сприяючи включенню його атомів до молекули гемоглобіну [103].

В дослідженні [215] річкову форель (*Salmo trutta*) піддавали впливу хлориду кобальту 0,18 мг/дм³) протягом 28 діб, при цьому відмічали зростання кількості еритроцитів, тромбоцитів та гематокриту. Проте, концентрація гемоглобіну була знижена внаслідок впливу іонів металу.

З одного боку, таке зростання рівня гемоглобіну може бути пов'язане з позитивним впливом іонів кобальту на вміст цього білку. Метаболічна функція кобальту включає його участь у процесах кровотворення та транспортуванні кисню гемоглобіном та іншими кров'яними пігментами. Він є необхідним елементом для синтезу гемоглобіну, діючи опосередковано через вітамін B₁₂, до складу якого він входить [103].

Водночас, збільшення концентрації гемоглобіну може бути результатом утворення його неактивних форм під впливом іонів кобальту. Дія цих іонів здатна впливати на третинну структуру білків, зокрема спричиняючи занурення неполярних радикалів амінокислот у внутрішнє гідрофобне середовище молекули. Це потенційно може призвести до змін у структурі гемоглобіну та порушити його функціональну активність [126].

4.3. Вміст окремих метаболітів у крові риб

Для оцінки рівня стресу у риб одним з найкращих показників є концентрація глюкози в їхній крові [83]. Результати аналізу підтвердили видову специфіку зміни концентрації глюкози у крові риб за дії іонів кобальту (рис. 4.5). Вміст глюкози в крові контрольної групи карасів склав 5,2 ммоль/дм³, а у щуки – 4,6 ммоль/дм³. Під впливом іонів кобальту в концентраціях 0,1 та 0,25 мг/дм³ у воді спостерігалось зростання рівня глюкози в крові обох видів риб. У карасів це зростання становило відповідно 1,3 та 1,1 рази, а у щуки – 1,2 та 1,4 рази. Таке збільшення, ймовірно, пов'язане зі зростанням енергетичних витрат організму риб, спрямованих на протидію токсичному впливу кобальту. За стресових ситуацій, рівень глюкози в крові зростає [193], що пов'язано зі збільшеною потребою в енергії через мінливі умови навколишнього середовища.

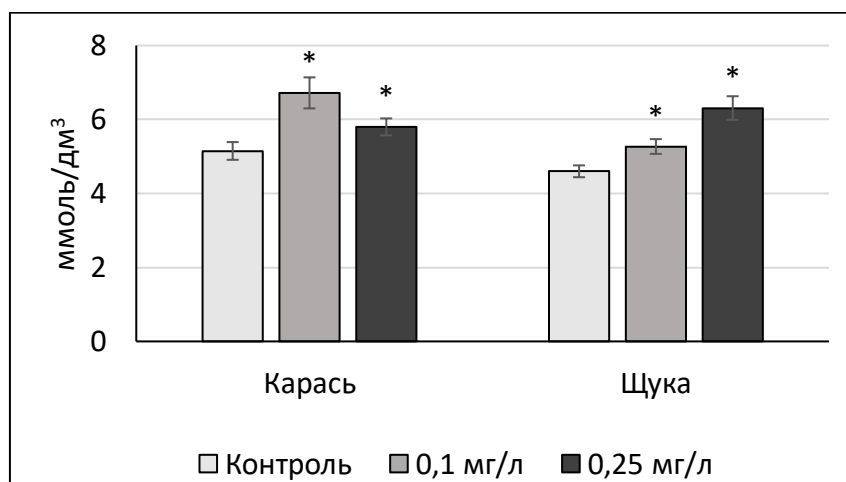


Рис. 4.5. Концентрація глюкози у плазмі крові риб за дії сублетальних концентрацій кобальту ($M \pm m$, $n=5$)

Концентраційний аналіз лактату в крові контрольної групи *Carassius gibelio* виявив статистично значно вищі показники (1,6 ммоль/дм³) порівняно з *Esox lucius* (1,2 ммоль/дм³), що відображено на рис. 4.6. Дана відмінність, імовірно, є наслідком специфіки метаболічних процесів, характерних для бентофагів та хижих видів риб. В експериментальних групах рівень лактату у досліджуваних видів корелював з концентрацією іонів металу в сердовищі інкубації.

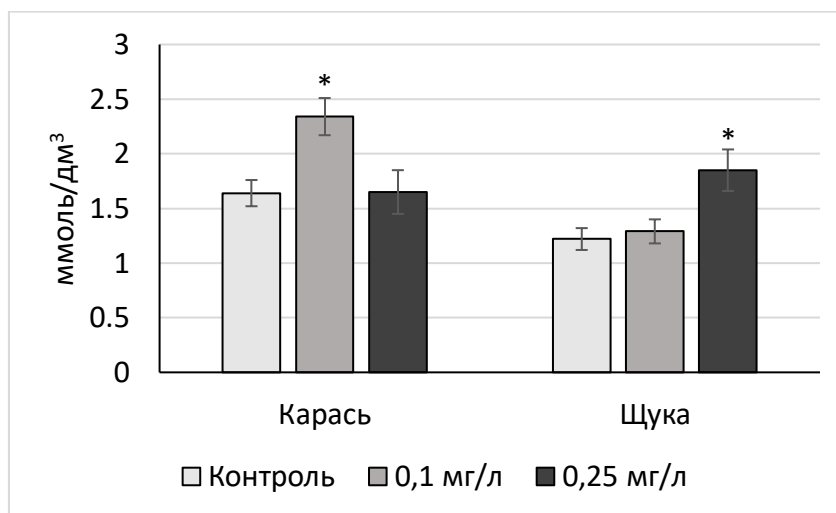


Рис. 4.6. Концентрація лактату у крові риб за дії сублетальних концентрацій кобальту ($M \pm m$, $n=5$)

Зокрема, у карасів спостерігалось 1,4-кратне збільшення концентрації молочної кислоти при дії 0,1 мг/дм³ Co^{2+} з наступною нормалізацією при підвищенні концентрації до 0,25 мг/дм³. У щук вплив 0,1 мг/дм³ Co^{2+} був незначним, проте при концентрації 0,25 мг/дм³ відзначалося зростання рівня лактату в 1,5 рази, що може свідчити про індукцію анаеробного гліколізу.

Аналіз крові контрольних груп карася та щуки показав, що концентрація піровиноградної кислоти становила 90,5 мкмоль/дм³ та 135,4 мкмоль/дм³ відповідно (рис. 4.7). Вплив низької концентрації іонів кобальту на рівень пірувату в крові обох досліджуваних видів риб був статистично незначним. Однак, підвищення концентрації іонів металу до 0,25 мг/дм³ призвело до

суттєвих змін: у крові карася спостерігалось зростання вмісту пірувату в 1,6 рази, тоді як у крові щуки відзначалося його зменшення в 1,3 рази.

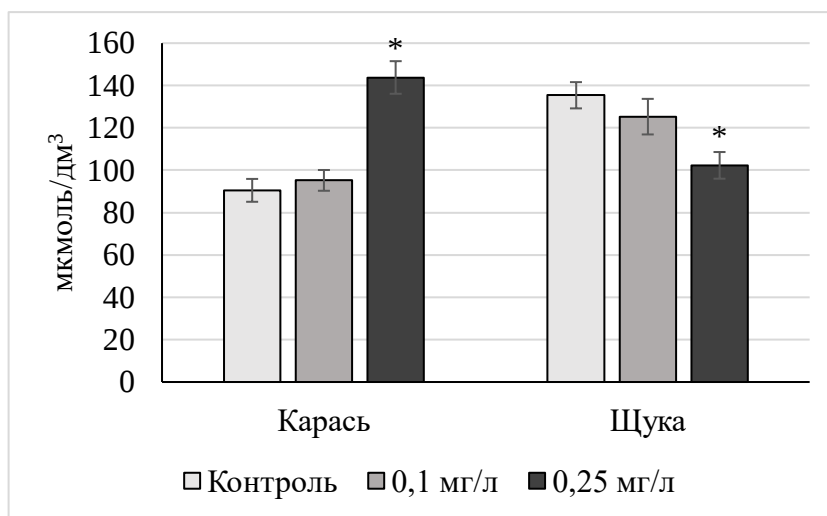


Рис. 4.7. Концентрація пірувату у крові риб за дії сублетальних концентрацій кобальту ($M \pm m$, $n=5$)

Збільшення метаболічного коефіцієнта лактат/піруват у крові може слугувати вагомим діагностичним критерієм, що відображає активацію анаеробного гліколізу в організмі тварин [174].

Дослідження показало, що співвідношення концентрацій лактату та пірувату в крові карася зазнавало змін залежно від концентрації іонів металу: при 0,1 мг/дм³ спостерігалось зростання в 1,3 рази, а при збільшенні концентрації до 0,25 мг/дм³ відбувалося зниження цього показника в 1,6 рази (рис. 4.8). У щуки ж відзначалися нижчі вихідні значення співвідношення молочної та піровиноградної кислот порівняно з карасем, і спостерігалася тенденція до його зростання зі збільшенням вмісту іонів кобальту у водному середовищі.

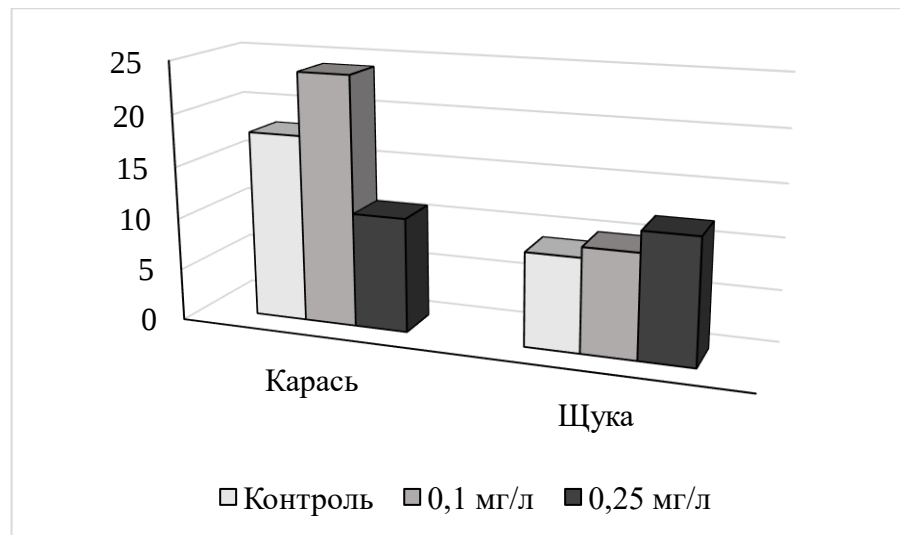


Рис. 4.8. Відношення концентрації лактат/ піруват у крові риб за дії сублетальних концентрацій кобальту ($M \pm m$, $n=5$)

Кобальт може імітувати ефекти гіпоксії, активуючи шлях HIF-1 α (гіпоксії-індукований фактор транскрипції 1 альфа). Тобто метал може спричиняти відповіді клітин риб, подібні до тих, що виникають при низькому рівні кисню, наприклад, стимулювати анемію або змінювати метаболізм. У тварин це може впливати на регуляцію таких процесів, як ендогенна гідратація, метаболізм та адаптивні механізми до стресу [143].

4.4. Активність лактатдегідрогенази у плазмі крові риб

Згідно аналізу активності лактатдегідрогенази (ЛДГ) у плазмі крові риб (рис. 4.9), виявлено прямий зв'язок між рівнем активності цього ферменту та співвідношенням лактат/піруват. Зокрема, у карася спостерігалось збільшення активності ЛДГ у 1,6 раза при концентрації іонів металу 0,1 мг/дм³, а при підвищенні концентрації до 0,25 мг/дм³ – зниження у 2,3 раза. У плазмі крові щуки ж активність ЛДГ зростала пропорційно збільшенню концентрації металу у воді, що, ймовірно, є ознакою токсичного впливу.

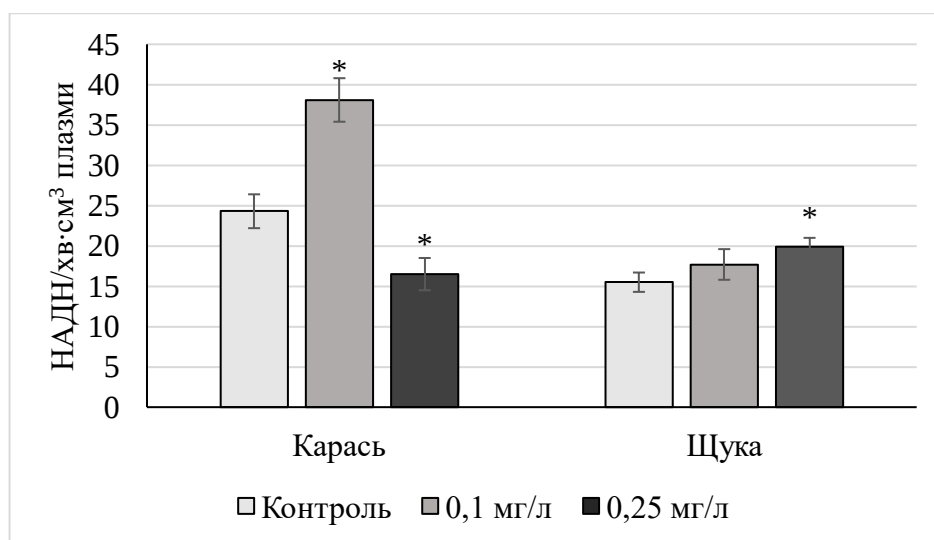


Рис. 4.9. Активність лактатдегідрогенази у крові риб за дії сублетальних концентрацій кобальту (мкмоль НАДН/хв·мл плазми, $M \pm m$, $n=5$)

Пригнічення активності ЛДГ може відображати інактивацію ферменту, тоді як стимуляція його може свідчити про підвищену залежність від анаеробного вуглеводного обміну [115].

4.5. Фракційний склад білків сироватки крові прісноводних риб за дії іонів кобальту

Білки плазми крові риб являють собою складну хімічну систему, що чутливо відображає фізіологічний стан організму та його реакції на внутрішні й зовнішні впливи [124]. Висока мобільність білкових компонентів плазми крові не призводить до значних коливань їхньої загальної концентрації, яка є видовою ознакою риб [131]. Аналіз електрофоретичних спектрів білків сироватки крові різних видів виявляє міжвидову варіабельність, що відображається у кількісному розподілі білка між фракціями, а також у кількості та відносній рухливості цих фракцій [51, 168]. Вміст загального білка та фракційний склад білків сироватки крові риб залежить від сезону, фізіологічного стану організму та віку [181].

Саме тому наступним етапом нашого дослідження стало вивчення впливу підвищених концентрацій іонів Co^{2+} на фракційний склад білків плазми крові риб.

4.5.1. Загальний вміст білка у плазмі крові риб

Зміни у вмісті білків сироватки крові, які характеризуються значною мінливістю, можуть бути показником розвитку несприятливих процесів у організмі риб [32].

Аналіз отриманих результатів показав, що за дії іонів кобальту показник сумарного вмісту білків у сироватці крові карася зростає. За дії металу в кількості $0,1 \text{ мг/дм}^3$ він збільшується на 19,0 %, а при $0,25 \text{ мг/дм}^3$ – на 25,0 % (рис. 4.10) . На думку автора [5] за дії металу порушується іонний баланс та концентрація білків у сироватці крові риб, що призводить до зміни осмотичного тиску. Ймовірно, згущення крові внаслідок цих змін є однією з головних причин відхилення досліджуваного показника від норми.

Проте, у щуки спостерігалось зворотнє явище: під впливом іонів кобальту досліджуваний показник знизився на 6,1 % при концентрації $0,1 \text{ мг/дм}^3$ та на 15,8 % при $0,25 \text{ мг/дм}^3$. Можливо, різниця в реакції організмів карася та щуки пояснюється особливостями їхнього метаболізму та способу життя, адже карась є бентофагом (живиться організмами дна), а щука – хижаком.

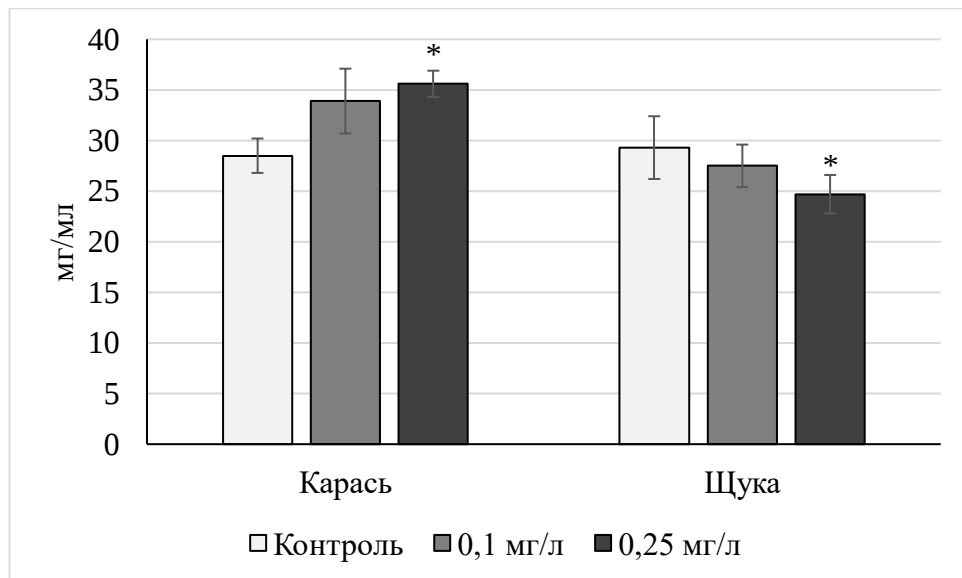


Рис. 4.10. Вміст загального білку в плазмі крові риб за дії сублетальних концентрацій кобальту ($M \pm m$, $n=5$)

Імовірно, високі концентрації іонів кобальту спричиняють руйнування білків печінки, що, своєю чергою, призводить до їх підвищення в сироватці крові карася. Одночасно, зростання рівня білків може бути зумовлене збільшенням кількості альбуміну як адаптивна реакція на порушення газового обміну та осморегуляції [217].

Доведено, що підвищені рівні іонів металів істотно змінюють як загальну кількість білків у сироватці крові риб, так і їхній фракційний розподіл [100, 106, 120]. Наші результати підтверджують ці спостереження, показуючи зміни у фракційному складі білків сироватки крові досліджуваних видів риб під впливом іонів кобальту. Електрофоретичний аналіз сироватки крові карася та щуки виявив п'ять основних фракцій, що узгоджується з літературними даними. [5]. Для аналізу отриманих результатів використано номенклатуру Тізеліуса, згідно якої виділено альбумін, α_1 , α_2 , β та γ -глобуліни (див. рис. 2.2).

4.5.2. Альбумін

У досліджуваних видів риб відзначено, що відносна кількість альбуміну в сироватці крові становить близько 10% у *Carassius gibelio* та 11,5% у *Esox lucius* (рис. 4.11). Альбумін відіграє критичну роль у забезпеченні колоїдно-

осмотичного гомеостазу крові та є важливим джерелом амінокислот для метаболічних процесів. Крім того, він є основним транспортним білком для широкого спектра лігандів, включаючи низькомолекулярні (амінокислоти, жирні кислоти, вітаміни, гормони, катіони, токсини) та високомолекулярні сполуки [40].

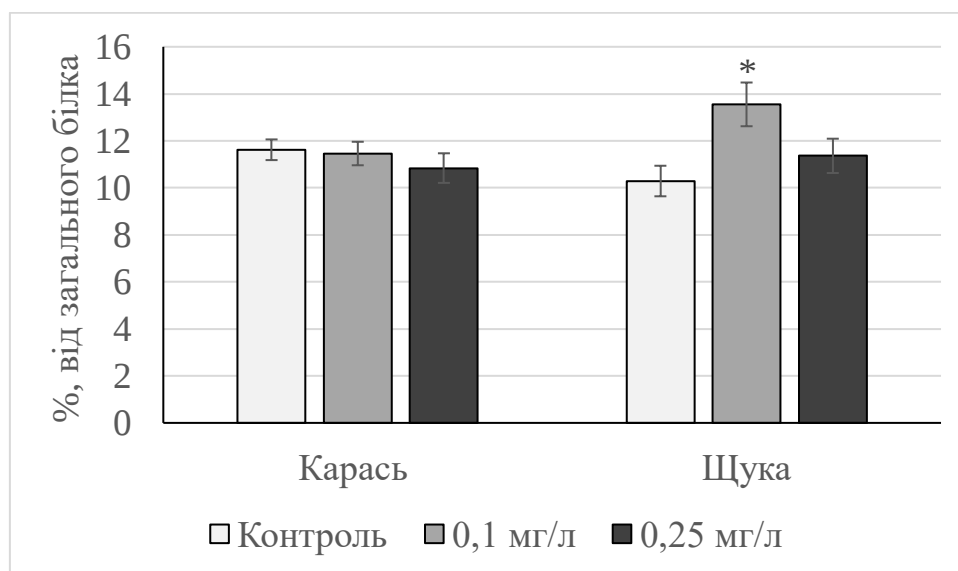


Рис. 4.11. Частка альбуміну у плазмі крові риб за дії іонів кобальту (% від загального вмісту білків, $M \pm m$, $n = 5$)

Дія підвищених концентрацій кобальту на організм карасів демонструє дозозалежний вплив на рівень альбуміну в сироватці крові досліджених риб. Концентрація кобальту 0,1 мг/дм³ не викликала статистично достовірних змін, тоді як при 0,25 мг/дм³ спостерігалось зниження вмісту альбуміну на 6,7%. Вважається, що зменшення концентрації альбумінів зумовлене переважно пригніченням їхнього синтезу, а не посиленням катаболізму. Це може бути пов'язано з інгібуванням метаболічних шляхів синтезу білка або з конкурентним використанням необхідних субстратів для анаболічних чи катаболічних процесів, спрямованих на забезпечення пластичних та енергетичних потреб організму [128]. У дослідженні авторів [100] у коропа на ранніх стадіях інтоксикації свинцем було зафіксовано зменшення вмісту альбуміну в сироватці крові.

Якщо у карася кобальт практично не впливав або знижував рівень альбуміну, то у щуки спостерігалася протилежна тенденція. Дія кобальту в концентраціях 0,1 мг/дм³ та 0,25 мг/дм³ призводила до значного (на 31,7%) та помірного (на 10,4%) зростання вмісту альбуміну в сироватці її крові. Таке збільшення синтезу альбуміну може бути адаптивною реакцією, спрямованою на ефективніше виведення металу з організму шляхом його зв'язування та транспортування кровотоком з тканин [11].

Кобальт у сироватці крові значною мірою зв'язується з альбуміном, причому лише невелика частина (5-12% за оцінками авторів [204]) перебуває у вільному, іонізованому стані. Отже, зростання концентрації альбуміну може бути відображенням активізації транспортних процесів, спрямованих на виведення металу.

Відомо, що елімінація деяких металічних іонів з організму тісно пов'язана з їхнім біотрансформацією та екскрецією через гепатобіліарну систему. Зокрема, іони металів транспортуються до жовчного міхура, звідки з жовчю надходять у кишечник для подальшого виведення. Отже, спостережуване зростання концентрації альбуміну у відповідь на підвищені рівні кобальту у водному середовищі може бути залучене до цих процесів детоксикації та елімінації [19].

4.5.3. Глобуліни

Глобуліни сироватки крові представляють собою гетерогенну групу білків, залучених до різноманітних фізіологічних процесів, включаючи транспорт ліпідів, гормонів, вітамінів та металічних іонів, а також формування ключових компонентів гемостатичної системи. Фракція γ -глобулінів складається з імуноглобулінів, що є основними ефекторними молекулами гуморального імунітету [129]. В рамках проведеного дослідження методом електрофорезу білки сироватки крові *Carassius carassius* та *Esox lucius* були розділені на α_1 , α_2 , β та γ -глобулінові фракції. Кількісне визначення білка у фракціях виявило домінування β -глобулінів в обох видів, тоді як мінімальний

вміст спостерігався у фракції α_2 -глобулінів у *Esox lucius* та γ -глобулінів у *Carassius gibelio*.

Аналіз впливу іонів кобальту на концентрацію білків α_1 -глобулінової фракції виявив видоспецифічні реакції. У *Carassius gibelio* експозиція до кобальту в концентрації 0,1 мг/дм³ призводила до зниження вмісту α_1 -глобулінів на 18,1%, тоді як при концентрації 0,25 мг/дм³ спостерігалось незначне зростання на 7,0%. У *Esox lucius*, навпаки, обидві досліджувані концентрації кобальту (0,1 мг/дм³ та 0,25 мг/дм³) викликали збільшення вмісту білків α_1 -фракції на 15,2% та 11,3% відповідно (рис. 4.12).

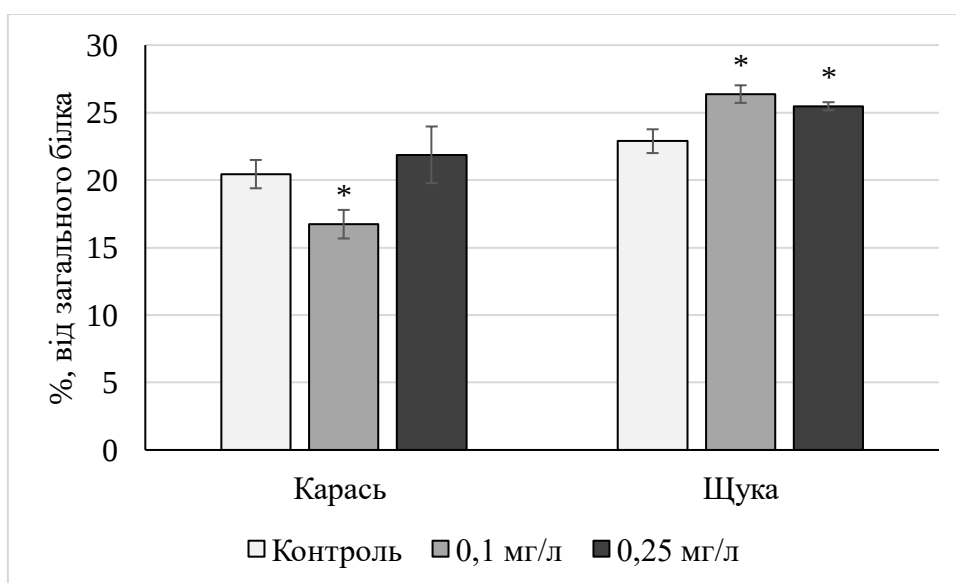


Рис 4.12. Частка α_1 -глобулінів у плазмі крові риб за дії іонів кобальту (% від загального вмісту білків, $M \pm m$, $n = 5$)

До складу α_1 -глобулінів входять антитрипсин (інгібує трипсин та інші протеїнази), антихімотрипсин (інгібує хімотрипсин), ліпопротеїни (транспорт ліпідів), протромбін та інші білки. Оскільки, як показали автори [132], метали здатні пригнічувати активність певних протеїназ, спостережуване зниження вмісту інгібіторів цих ферментів (α_1 -глобулінів) може бути частиною комплексної відповіді організму на підвищений рівень металу в тканинах. Ця реакція особливо важлива в м'язах, де концентрація кобальту значно зростає при його підвищеному вмісті у воді [6].

Аналіз змін відносного вмісту α_2 -глобулінової фракції сироватки крові риб під впливом іонів кобальту виявив певні видові особливості (4.13). У

Carassius gibelio спостерігалось значніше зниження рівня α_2 -глобулінів при обох досліджуваних концентраціях металу (0,1 мг/дм³ та 0,25 мг/дм³). У *Esox lucius* зниження вмісту цієї фракції було менш вираженим і спостерігалось лише за концентрації кобальту 0,25 мг/дм³ (на 6,9%), тоді як концентрація 0,1 мг/дм³ практично не впливала на даний показник. Максимальні відхилення від контрольних значень були зареєстровані при дії кобальту в концентрації 0,25 мг/дм³ у *Carassius gibelio* (зниження на 20,5%) та *Esox lucius* (зниження на 6,9%).

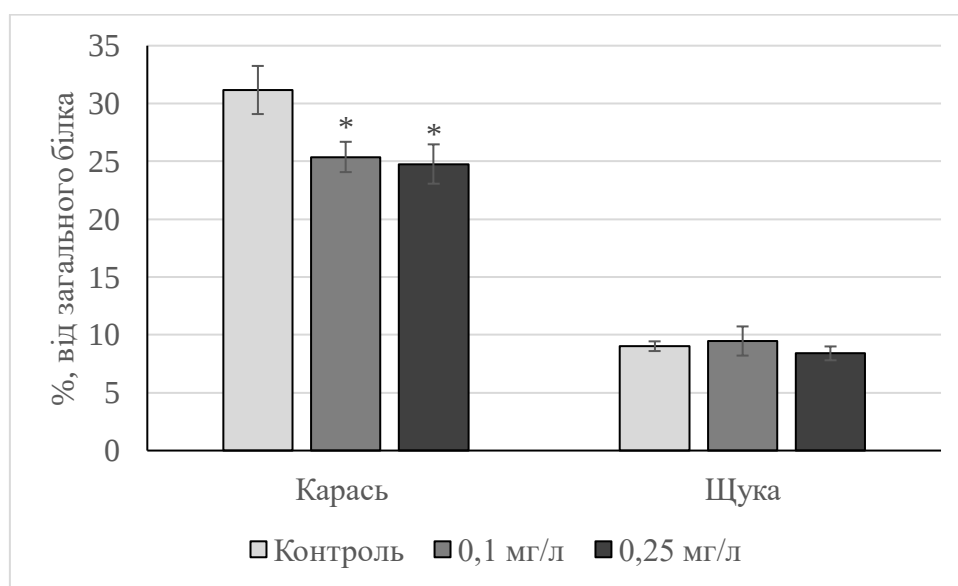


Рис. 4.13. Частка α_2 -глобулінів у плазмі крові риб за дії іонів кобальту (% від загального вмісту білків, $M \pm m$, $n = 5$)

Зниження відносного вмісту білків α_2 -глобулінової фракції у відповідь на підвищені концентрації іонів кобальту може бути пов'язане з якісним складом даної фракції, зокрема з наявністю макроглобуліну, що виконує функцію транспорту іонів металів. Зменшення концентрації білків цієї фракції може бути обумовлене: (1) інгібуванням процесів синтезу білків у гепатоцитах внаслідок токсичної дії металу; (2) активацією процесів катаболізму метал-зв'язуючих білків у зв'язку з інтенсифікацією транспорту іонів металу до органів елімінації, що призводить до переважання швидкості деградації над синтезом; (3) відносним зменшенням вмісту α_2 -глобулінів внаслідок зростання частки білків інших фракцій, зокрема альбуміну, що було зафіксовано у *Esox lucius*.

Аналіз β -глобулінової фракції виявив зростання вмісту білків у сироватці крові *Carassius gibelio* під впливом обох досліджуваних концентрацій кобальту: на 35,8 % при 0,1 мг/дм³ та на 14,5 % при 0,25 мг/дм³ (рис. 4.14)

Відомо [128], що β -глобулінова фракція містить трансферин, білок, який здійснює транспорт іонів заліза. Спостережуване збільшення вмісту цієї фракції в сироватці крові *Carassius gibelio* під впливом іонів кобальту може бути пов'язане з активацією еритропоезу. Кобальт відомий своїм стимулюючим впливом на гемопоетичну функцію, що може призводити до підвищеного синтезу трансферину для забезпечення транспорту заліза, необхідного для утворення нових еритроцитів.

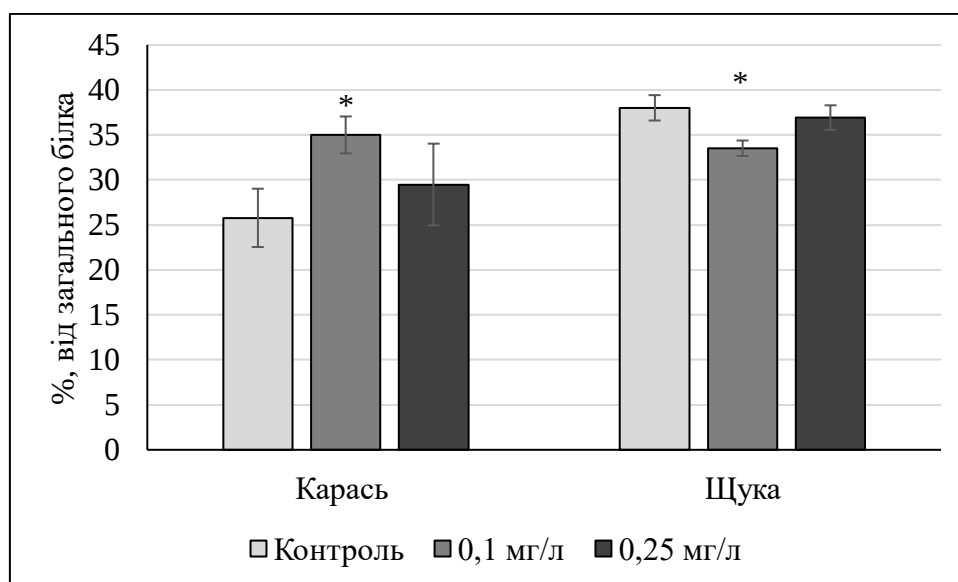


Рис.4.14. Частка β -глобулінів у плазмі крові риб за дії іонів кобальту (% від загального вмісту білків, $M \pm m$, $n = 5$)

Встановлено, що в плазмі крові *Esox lucius* зростання концентрації іонів кобальту у водному середовищі корелює з незначним зниженням вмісту білків фракції β -глобулінів. Даний ефект може бути обумовлений як інгібуванням процесів біосинтезу зазначеної фракції, так і посиленням її залучення до метаболічних та структурних адаптацій, спрямованих на забезпечення гомеостазу в умовах зміненого гідрохімічного балансу.

Щодо γ -глобулінів, білків, які в основному пов'язують з резистентними властивостями організму риб, то їхня кількість у карася та щуки змінювалася по-різному. (рис 4.15). Так, у карася відмічено тенденцію до зростання частки γ -глобулінів на 4,1 % за дії 0,1 мг/дм³ та на 18,7 % за дії 0,25 мг/дм³ іонів кобальту у середовищі інкубації. У щуки ж, навпаки, вміст білків цієї фракції достовірно знижується на 13,8 % при 0,1 мг/дм³ та на 10,0 % при 0,25 мг/дм³ металу у середовищі інкубації.

Згідно результатів досліджень автора [124], середні значення кількості імуноглобулінів були вищими у коропів лускатих, які піддавалися дії підвищених концентрацій іонів кадмію та свинцю. Для тілапії (*Tilapia nilotica*) було відмічено інший ефект: вплив сульфату кадмію (0,5 мг/дм³) призводив до значного зниження рівня γ -глобулінів [240], що автори пояснюють високим рівнем гормону стресу кортизолу, гіперглікемією та пригніченням імунної системи дослідних риб.

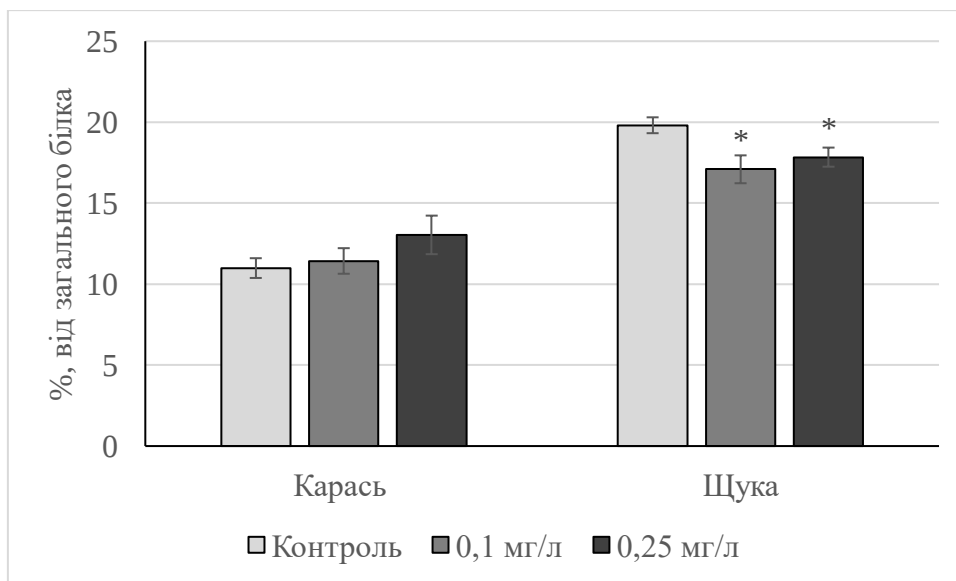


Рис 4.15. Частка γ -глобулінів у плазмі крові риб за дії іонів кобальту (% від загального вмісту білків, $M \pm m$, $n = 5$)

Зростання концентрації γ -глобулінів сироватки крові є індикатором активації процесів імуногенезу, незважаючи на те, що імунокомпетентні молекули становлять лише субпопуляцію загального пулу білків даної фракції. Слід зазначити, що при гострих запальних реакціях спостерігається

паралельне збільшення вмісту білків α -фракцій [5]. Крім того у фракціях β - і γ -глобулінів при електрофорезі під час запальних процесів зростає кількість С-реактивного білку [129]. С-реактивний білок це білок гострої фази запалення, що синтезується в печінці у відповідь на різні пошкодження тканин, інфекції та запальні процеси в організмі риб. Його рівень у крові швидко зростає при таких станах, що робить його важливим маркером запалення [22].

Хоча, прямих даних про вплив саме важких металів на рівень С-реактивного білку в риб в наявних результатах немає, дослідження показують, що рівень цього білку може змінюватися залежно від виду риби та типу запального стресу. Так, за дії 0,5 та 1 ppm іонів кадмію протягом 14 діб було виявлено достовірне підвищення рівня С-реактивного білку у *Cyprinus carpio* L. та *Hypophthalmichthys molitrix* риб порівняно зі здоровими рибами [71].

Можливо зростання частки γ -глобулінів за інтоксикації сублетальними концентраціями іонів кобальту також пов'язано з цим білком.

4.5.4. Аналіз співвідношення альбумін/глобуліни

Оцінка кількісних взаємозв'язків між фракціями альбумінів та глобулінів, що відображається у вигляді білкового коефіцієнта, має значне діагностичне значення. Альбумін-глобуліновий коефіцієнт є інформативним індексом, що дозволяє відстежувати відносні зміни компонентного складу білків сироватки крові у риб [120].

Альбумін та глобуліни є основними білковими компонентами сироватки крові, і будь-які кількісні зміни в їхньому вмісті призводять до дисбалансу співвідношення альбумін/глобулін (А/Г). Зниження значення цього коефіцієнта може свідчити про наявність гепатопатологій у досліджуваних видів риб [125].

Аналіз коефіцієнта альбумін/глобулін (А/Г) у досліджуваних видів риб виявив відсутність значних змін у *Carassius gibelio* та незначне зростання у *Esox lucius* під впливом кобальту в обох досліджуваних концентраціях (рис. 4.16). Отримані результати є співмірними з даними, наведеними в роботі [5],

де також було зафіксовано підвищення білкового коефіцієнта у *Cyprinus carpio* при експозиції до іонів мангану, цинку, міді та свинцю.

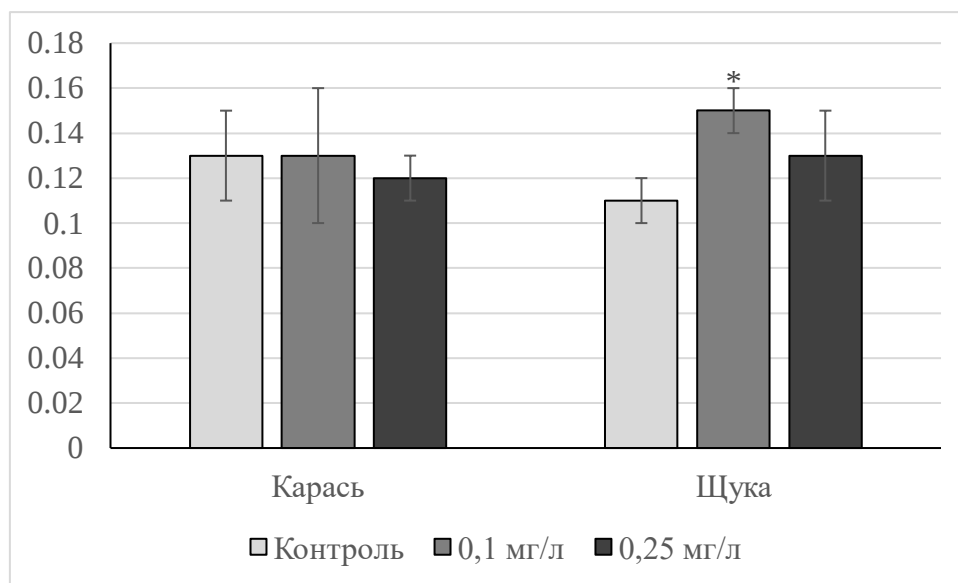


Рис. 4.16. Значення співвідношення А/Г в плазмі крові риб за дії іонів кобальту (, $M \pm m$, $n = 5$)

Автор інтерпретує спостережуване зростання білкового коефіцієнта як результат змін у відносному вмісті основних білкових фракцій сироватки крові риб, а саме: збільшення процентної частки альбумінів та супутнє зниження вмісту окремих фракцій глобулінів.

Висновки до розділу 4.

Коливання гематологічних показників можуть слугувати початковим показником впливу токсикантів на процеси метаболізму в організмі риб. Насамперед це проявляється у вигляді фізіологічних змін, які відображаються на гематологічних параметрах, таких як, кількість еритроцитів, гематокрит, гемоглобін тощо. Тому, аналіз крові риб є інформативним індикатором їхнього фізіологічного стану під впливом токсичних іонів важких металів. Зміни гематологічних показників залежать як від концентрації металу у водному середовищі, так і від особливостей конкретного виду риб. Важливо, що в крові досліджуваних видів – карася та щуки – не було виявлено накопичення кобальту навіть при його підвищеному вмісті у воді. У карася зростання кількості еритроцитів, гематокриту та гемоглобіну спостерігалось

лише при відносно низькій концентрації іонів кобальту ($0,1 \text{ мг/дм}^3$), тоді як у щуки аналогічні зміни відбувалися за вищої концентрації металу у воді ($0,25 \text{ мг/дм}^3$).

Спостерігаються видові відмінності в реакції риб на сублетальні концентрації іонів кобальту у воді. На відміну від карася, у щуки при високій концентрації іонів металу ($0,25 \text{ мг/дм}^3$) посилюється значення анаеробних шляхів отримання енергії, про що свідчить збільшення рівня лактату та активності ЛДГ паралельно зі зменшенням кількості пірувату. У карася ж активація анаеробного метаболізму відбувається вже за нижчої концентрації іонів металу ($0,1 \text{ мг/дм}^3$). Узагальнюючи отримані дані, можна зробити висновок про значну лабільність гематологічних показників риб, що відображає їхню високу чутливість до змін лімітуючих чинників водного середовища. У зв'язку з цим, застосування гематологічного аналізу, що базується на дослідженні біохімічних параметрів крові, є перспективним підходом для прогнозування фізіологічних змін в організмі риб під впливом різноманітних екологічних стресорів, включаючи важкі метали. Проведене нами дослідження показало, що підвищені концентрації іонів кобальту індукують зміни як загальної концентрації білків сироватки крові, так і їхнього фракційного складу, що свідчить про залучення компенсаторних або розвиток патологічних процесів в органах та тканинах риб. Відзначено різну реакцію досліджених видів риб на концентрацію загальних білків у плазмі крові: у карася спостерігалася тенденція до збільшення їх вмісту, а у щуки – до зменшення.

Дія $0,1$ та $0,25 \text{ мг/дм}^3$ іонів Co^{2+} призводила до статистично достовірного збільшення загального білка у плазмі крові карася на $18,9\%$ та $24,8\%$ відповідно. На противагу цьому, у щуки спостерігалось достовірне зниження загального білка на $15,8\%$ лише за впливу $0,25 \text{ мг/дм}^3 \text{ Co}^{2+}$.

Аналіз фракційного складу білків виявив відсутність значних змін у рівні альбуміну та γ -глобулінів у сироватці крові карася під впливом досліджуваних концентрацій кобальту. Однак, дія $0,1 \text{ мг/дм}^3$ іонів Co^{2+}

спричиняла зменшення вмісту α_1 - та α_2 -глобулінів і збільшення β -глобулінів. У сироватці крові щуки відзначено достовірне зростання концентрації альбуміну та α_2 -глобулінів і зниження вмісту β - та γ -глобулінів під впливом 0,1 мг/дм³ Co^{2+} . Вплив 0,25 мг/дм³ іонів Co^{2+} на сироватку крові щуки характеризувався зростанням кількості β -глобулінів та зниженням γ -глобулінів.

Достовірне збільшення альбумін-глобулінового коефіцієнту спостерігалось виключно у сироватці крові *Esox lucius* за дії 0,1 мг/дм³ іонів кобальту.

Із усього сказаного слідує, що перспективним напрямком подальших досліджень є вивчення адаптивних реакцій системи крові прісноводних риб як індикатора їхнього фізіологічного стану та інструменту біомоніторингу гідроекосистем, забруднених важкими металами, зокрема кобальтом.

Подальше дослідження адаптивних реакцій гематологічної системи риб та ідентифікація інтегральних гематологічних маркерів, здатних відображати ключові зміни гомеостазу при екстремальних впливах водного середовища, є важливим напрямком для оцінки токсичного забруднення екосистем та здійснення екологічного моніторингу.

РОЗДІЛ. V. ПОКАЗНИКИ ОКИСНОГО СТРЕСУ В КРОВІ РИБ ЯК БІОМАРКЕРИ ІНТОКСИКАЦІЇ ІОНАМИ КОБАЛЬТУ

Молекулярні біомаркери окисативного стресу широко використовуються для дослідження механізмів токсичності забруднюючих речовин та їхнього впливу на водні екосистеми. Водне середовище постійно зазнає надходження значної кількості хімічних сполук, здатних індукувати окисативний стрес у гідробіонтів через утворення вільних радикалів [114]. Водні організми є зручною модельною системою для вивчення процесів пошкодження клітинних компонентів активними формами кисню (АФК), реакції клітин на цей стрес, ефективності відновлювальних механізмів та ролі окисативного стресу у розвитку захворювань. Важливо зазначити, що водні організми є більш вразливими до впливу токсикантів порівняно з наземними, включаючи ссавців [110, 213].

Окислювальний стрес є наслідком порушення гомеостазу між проокисантними та антиокисантними механізмами на користь генерації реактивних видів кисню. Незважаючи на зростаюче розуміння взаємозв'язку окисних процесів, змін довкілля та стратегій життєвого циклу, основна частина досліджень зосереджена на таксонах Aves та Mammalia. Риби, що мають значну екологічну та соціально-економічну цінність, отримують менше дослідницької уваги в цьому контексті.

Дослідження показують, що окислювальний стрес є центральним елементом у тому, як риби адаптуються до змін навколишнього водного середовища та реалізують свої життєві стратегії. Антропогенні забруднення впливають на рівень окисного стресу у риб, і тому його показники все частіше використовуються як біомаркери для з'ясування механізмів дії різних стресорів та їхніх фізіологічних наслідків на просторовий і часовий розподіл риб протягом їхнього життя. Специфічного біомаркера окисативного стресу, спричиненого металами, не існує, тому слід застосовувати комплексний підхід [17].

Загальновідомо, що кобальт опосередковує виникнення оксидативного стресу, який сприяє клітинній токсичності та загибелі [61]. Однак механізми цих ефектів до кінця не зрозумілі.

Тому ми досліджували концентрацію малонового діальдегіду, дієнових конюгатів та гідропероксидів ліпідів як показник перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), а також активність супероксиддисмутази та каталази використовували як показники антиоксидантної здатності організму.

5.1. Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів у крові риб за дії іонів кобальту

Пероксидне окиснення ліпідів генерує різноманітні продукти, включаючи дієнові кон'югати, гідроперокси, оксикислоти та кетокислоти. Концентрація цих сполук відображає інтенсивність вільнорадикального пероксидного окиснення в різних тканинах риб і може бути використана як фізіолого-біохімічний маркер [143].

Оцінка гомеостазу між прооксидантами (екологічними забруднювачами) та антиоксидантним захистом (ферментативні та неферментативні компоненти) у тканинах є цінним інструментом для визначення токсичних ефектів, індукованих різноманітними хімічними агентами, серед яких і важкі метали. Збільшення генерації активних форм кисню (АФК) спричиняє оксидативний стрес, що проявляється, зокрема, у пероксидному окисненні ліпідів (ПОЛ) та інгібуванні ферментативної активності [145].

Перехідні метали, зокрема кобальт, здатні провокувати окислювальний стрес у прісноводних риб. Їхнє надмірне накопичення або збій у механізмах регуляції цього процесу може призвести до токсичного впливу [153]. Виходячи з цього, визначення інтенсивності ПОЛ у риб є об'єктивним методом оцінки ступеня забруднення водних екосистем важкими металами. [36].

Оскільки ПОЛ є одним із перших механізмів пошкодження клітин ксенобіотиками, то концентрації неферментативних маркерів оксидативного

стресу, таких як МДА, тісно корелюють зі зміненими умовами навколишнього середовища [61, 194].

ТБК-активні продукти. Малоновий діальдегід є вторинним продуктом пероксидного окиснення ліпідів, що утворюється з гідропероксидів. Його шкідлива дія проявляється у зв'язуванні ліпідів та зменшенні плинності біологічних мембран. Виявлення підвищеного вмісту ТБК-активних сполук у метаболічно активних тканинах може бути індикатором окисного стресу в організмі риб [76].

Підвищені концентрації іонів кобальту спричинили неоднакові зміни в кількості малонового діальдегіду у крові риб, як показали результати аналізу. Так, вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові карася обох дослідних груп практично не відрізнявся від контролю. У плазмі крові щуки першої дослідної групи вміст МДА знижувався у 1,2 рази, тоді як за дії 0,25 мг/дм³ зростав в 1,5 рази (рис. 5.1).

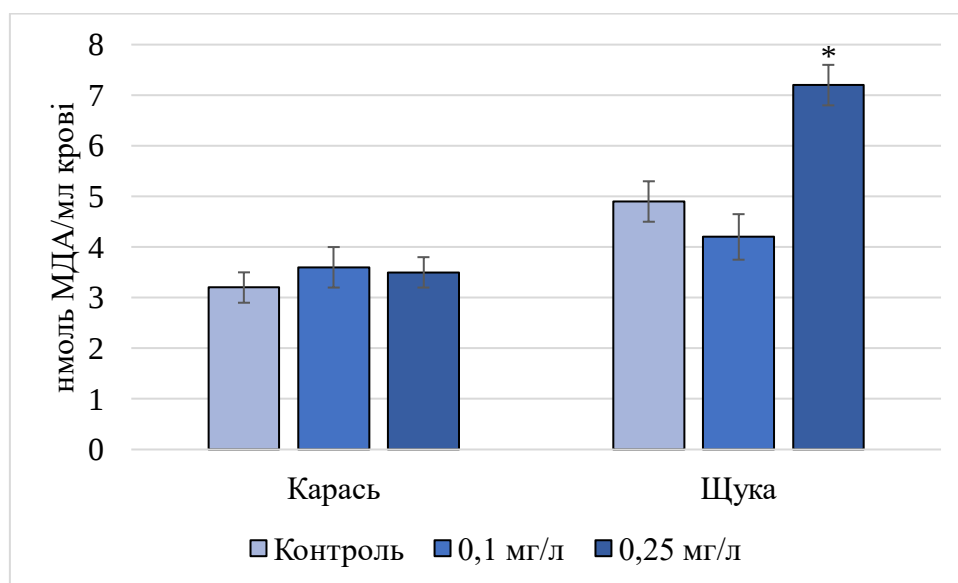


Рис. 5.1. Вміст ТБК-активних продуктів у крові риб за різного вмісту іонів Co^{2+} у воді ($M \pm m$, $n=5$).

Очевидно має місце видова та концентраційна залежність дії іонів металу на рівень МДА. Так, виживання та ранній розвиток ембріонів *Danio rerio* суттєво не зазнавали впливу кобальту в концентраціях <100 мкг/л, тоді

як рівень перекисного окислення ліпідів був підвищений у ембріонів риб, оброблених кобальтом, при концентраціях 100 та 500 мкг/л [218].

Дієнові кон'югати. Зміни вмісту дієнових кон'югатів у крові досліджуваних риб під дією іонів кобальту мали схожий характер. Так, вміст цих первинних продуктів ПОЛ у крові карася не зазнавав достовірних змін у обох дослідних групах риб, тоді як у щуки мало місце зниження концентрації ДК у 1,4 рази за дії 0,1 мг/дм³ іонів кобальту та її зростання зростання у 1,2 рази за впливу 0,25 мг/дм³ іонів металу. (рис. 5.2).

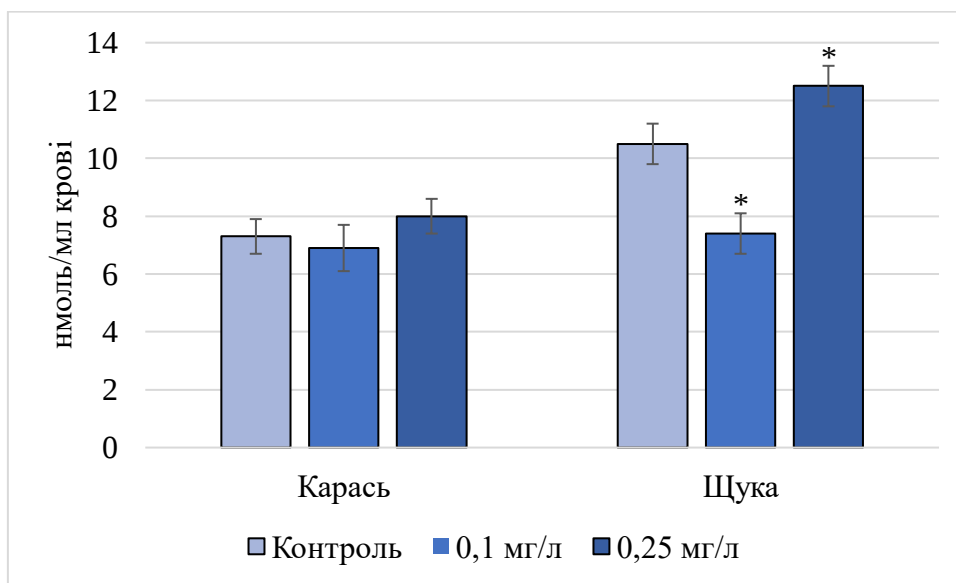


Рис. 5.2. Вміст дієнових кон'югатів у крові щуки за дії іонів Co^{2+} у воді ($M \pm m$, $n=5$).

Гідропероксили ліпідів. Ці метаболіти, як і дієнові кон'югати, є первинними продуктами пероксидного окиснення ліпідів. Аналіз кількості ГП ліпідів за впливу сублетальних концентрацій іонів Co^{2+} показав відсутність достовірних змін у крові карася (рис. 5.3). У крові щуки було відмічене зростання кількості ГП ліпідів пропорційне до концентрації іонів металу у воді: у 1,2 та 1,4 рази відносно контрольних значень.

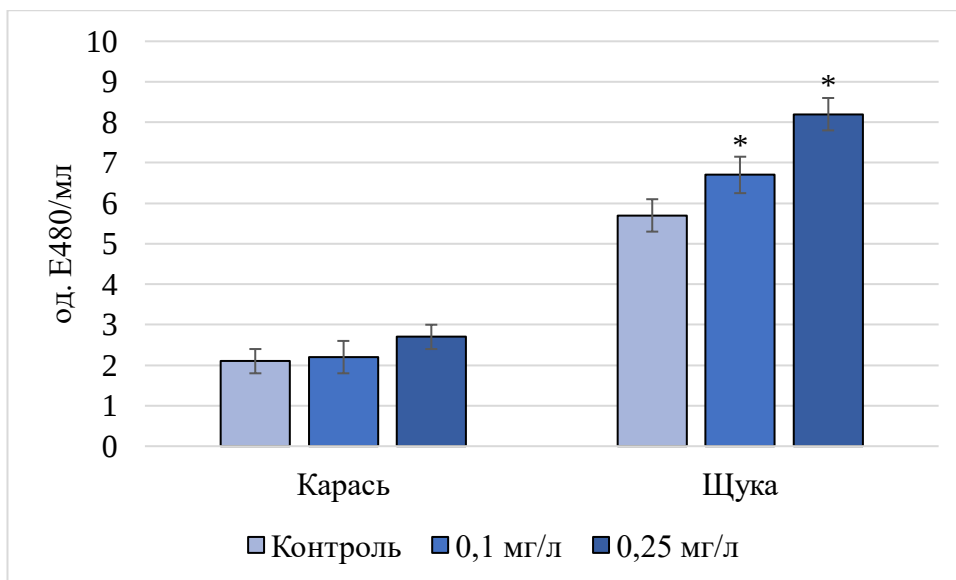


Рис. 5.3. Вміст гідропероксидів ліпідів у крові риб за дії іонів Co^{2+} у воді ($M \pm m$, $n=5$).

Отримані результати підкреслюють вищу резистентність карася порівняно зі щукою до дії сублетальних концентрацій кобальту.

5.2. Роль каталази та супероксиддисмутази у знешкодженні АФК за дії іонів кобальту

Окисний стрес виникає внаслідок порушення рівноваги між продукуванням АФК та ефективністю антиоксидантних систем захисту в організмі риб [88]. Клітини мають системи антиоксидантного захисту, як ферментні, так і неферментні, які здатні нейтралізувати [165].

У риб взаємодія між АФК та антиоксидантними системами підтримується низкою ферментів-антиоксидантів, які зв'язують та деактивують радикали. Ключову роль у нейтралізації АФК в організмі риб відіграють такі антиоксидантні ферменти, як супероксиддисмутаза та каталаза. Збільшення активності цих ферментів у крові може свідчити про наявність окисного стресу в організмі риб [85].

Каталаза відіграє важливу роль у запобіганні шкідливому впливу АФК на тканини риб та є високочутливою до дії іонів металу ферментом [72].

Як показали результати аналізу даних у плазмі крові карася мала місце тенденція до активації каталази за дії 0,1 мг/дм³ іонів кобальту та спостерігалось достовірне збільшення активності ензиму у 1,3 рази у другій дослідній групі риб при 0,25 мг/дм³ іонів металу (рис. 5.4).

Результати дослідження активності каталази в плазмі крові щуки під впливом підвищених концентрацій іонів кобальту у воді виявили чітку залежність змін від концентрації. Зокрема, дія іонів Co^{2+} у концентрації 0,1 мг/дм³ призводила до зниження активності каталази в печінці коропа на 14%, у той час як концентрація 0,25 мг/дм³ спричиняла дворазове зростання активності цього ферменту.

Тенденція до зниження рівня активності даного ензиму може бути пов'язана з прямою чи опосередкованою дією кобальту на структуру ферменту, депресією синтезу каталази або гальмуванням активності ензиму супероксидними радикалами [34].

Підвищення активності каталази може бути свідченням окисного стресу у риб. Так, підвищена активність каталази була виявлена в еритроцитах золотих рибок, що зазнали впливу кадмію протягом 15 днів [20].

Варто зазначити, що зміни в роботі каталази складно однозначно пояснити. Як вже згадувалося, вплив важких металів викликає різноспрямовані зміни в активності цього ферменту, що залежить від виду риб, тривалості впливу, особливостей різних тканин тощо [110].

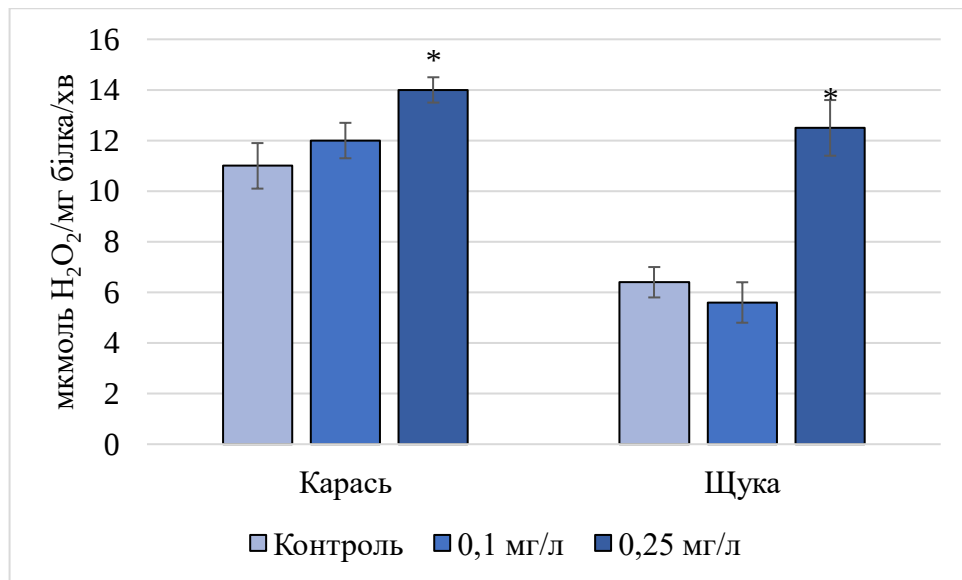


Рис. 5.4. Активність каталази у плазмі крові риб за дії сублетальних концентрацій іонів Co^{2+} у воді ($M \pm m$, $n=5$).

Якщо проаналізувати функціонування супероксиддисмутази (СОД) у плазмі карася, то можна відмітити подібний з каталазою характер змін за впливу обох концентрацій іонів кобальту (рис. 5.5). У риб першої дослідної групи порівняно до контролю спостерігалася тенденція до зростання активності фермента, тоді як за дії 0,25 мг/дм³ іонів Co^{2+} відмічено збільшення активності СОД на 30 % щодо контрольної групи риб.

У плазмі крові щуки спостерігалася збільшення активності ферменту в 1,4 рази під впливом іонів Co^{2+} у концентрації 0,1 мг/дм³, і особливо значне зростання – у 3 рази – при концентрації 0,25 мг/дм³. Таке підвищення активності СОД може вказувати на розвиток окисного стресу в організмі риб, індукованого іонами кобальту.

Зростання активності супероксиддисмутази (СОД) може бути також пов'язане зі стимуляцією експресії відповідних генів під впливом кобальту. Наприклад, у рибок даніо-реріо тривалий вплив кобальту спричиняв пошкодження ДНК сперматозоїдів, підвищував експресію генів, що беруть участь у відновленні ДНК у тканинах сім'яників та призводив до зниження репродуктивної здатності [63].

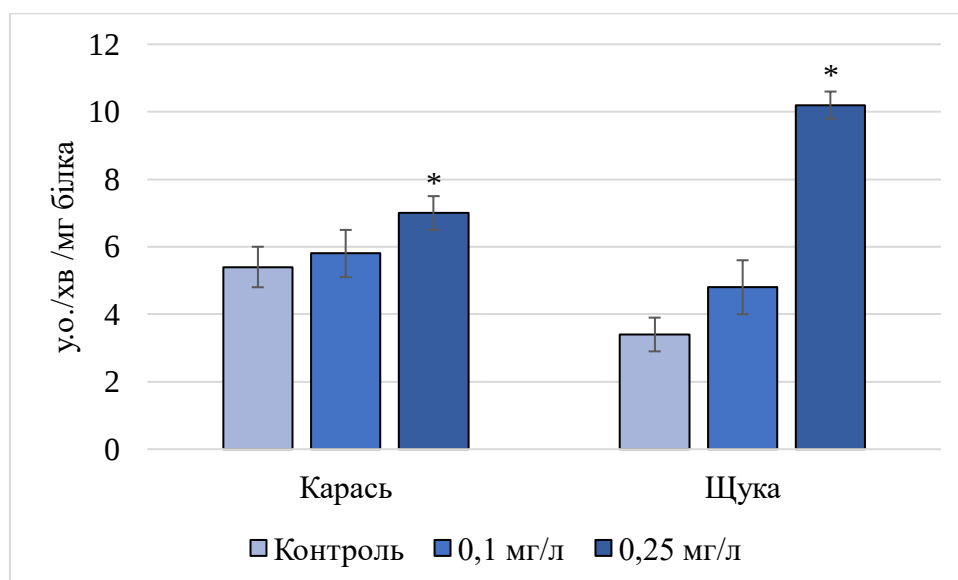


Рис. 5.5. Активність супероксиддисмутази в плазмі крові щуки за дії сублетальних концентрацій іонів Co^{2+} у воді ($M \pm m$, $n=5$).

Висновки до 5 розділу

Отже, підвищені концентрації іонів кобальту впливали на накопичення продуктів ПОЛ у крові щуки, тоді як у карся достовірних змін відмічено не було. Вища із досліджуваних концентрацій іонів металу (0,25 мг/дм³) індукувала ПОЛ у крові щуки, про що свідчило зростання рівня ТБК-активних продуктів, дієнових кон'югатів та гідропероксидів ліпідів. Натомість, вплив меншої концентрації іонів кобальту (II) (0,1 мг/дм³) спричиняв зменшення вмісту малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів, що може вказувати на антиоксидантний ефект низьких концентрацій цього металу.

Також слід зазначити, що підвищені концентрації іонів Co^{2+} у воді (0,25 мг/дм³) проявляють прооксидантну дію на організм риб, про що свідчать зміни в активності ферментів антиоксидантного захисту. Біомаркери оксидативного стресу можуть бути цінними інструментами для оцінки стану здоров'я водних організмів, однак для встановлення чіткого причинно-наслідкового зв'язку необхідні подальші, більш детальні дослідження.

РОЗДІЛ VI. ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ ФЕРМЕНТНИХ СИСТЕМ В ОРГАНІЗМІ ПРІСНОВОДНИХ РИБ ЗА ДІЇ ІОНІВ КОБАЛЬТУ

Ензиматичні системи можуть бути використані як чутливий біоіндикатор забруднення водних систем металами [37].

Як польових, так і лабораторних умовах виявлено, що реакція ферментів у тварин на метал є різною. Їх активність може зростати або знижуватися залежно від таких чинників, як концентрація забруднювача, його природа та спосіб потрапляння в організм [173].

Тому при проведенні досліджень необхідно враховувати чутливості цих ферментів, коли вони використовуються як біомаркери забруднення металами, так як реакції ферментів суттєво залежать від природи металів та їх концентрацій.

6.1. Процеси трансамінування за дії сублетальних концентрацій іонів кобальту

Внаслідок збільшення концентрації металів у неживих складниках водних екосистем, водні організми надмірно їх поглинають, що призводить до порушень у роботі їхніх метаболічних систем [5, 14].

Доведено, що дія важких металів на водні організми може проявлятися через активацію білкового обміну та лізосомального розщеплення білків [5], стимуляцію окисного дезамінування амінокислот [239], а також використання амінокислот як джерела енергії та попередників сполук, що відіграють важливу роль в адаптації до токсичного впливу [15].

Незважаючи на наявні дані, недостатньо з'ясовано, яким чином метали впливають на метаболізм амінокислот: активують чи пригнічують певні шляхи, як саме (прямо чи опосередковано) вони діють на ферменти білкового обміну, а також як вони визначають спрямованість і швидкість метаболічних процесів. Тому дослідження функціонування трансамінування в тканинах прісноводних риб за різних концентрацій важких металів у воді є важливим і

може стати теоретичною базою для створення методик біоіндикації забруднення водних екосистем.

Кобальт проявляє властивість активувати процеси протеїнового синтезу, що зумовлює акумуляцію білків у різних органах і тканинах риб. Так, додавання в кормові суміші риб сполук кобальту сприяло збільшенню біологічної маси дворічок коропів [1]. У дослідженні авторів [81] також було показано, що ріст, продуктивність та показники сироватки крові у молоді креветки (*Litopenaeus vannamei*) поліпшувалися за дії солей двовалентного кобальту. Зазначений метал також здійснює вплив на метаболізм та біологічну дію кальцію і фосфору. Зокрема, гіпокобальтемія у риб призводить до зниження ефективності засвоєння цих хімічних елементів [11].

Аналіз активності ензимів у тканинах гідробіонтів являє собою перспективний напрям у токсикологічному моніторингу для діагностики наслідків дії контамінантів. Процес трансамінування, що є одним з фундаментальних механізмів синтезу та деградації амінокислот, забезпечує інтеграцію вуглеводного та білкового метаболізму в умовах стресу з метою підтримання енергетичного гомеостазу організму.

Аспаратамінотрансфераза (АсАТ) та аланінамінотрансфераза (АлАТ) є важливими ензимами, зростання або зниження активності яких вказує на пошкодження тканин печінки, нирок, м'язів і зябер риб [70, 172].

З огляду на сказане нами було досліджено вплив підвищених концентрацій Co^{2+} у воді на активність ферментів трансамінування - аспаратат- та аланінамінотрансфери у тканинах риб.

6.1.1. Активність АсАТ у риб за інтоксикації іонами кобальту

Динаміка вмісту окремих амінокислот у м'язовій та печінковій тканинах риб, що спостерігається при експозиції до іонів важких металів, дає підстави вважати, що роль трансаміназ полягає не в прямій елімінації токсикантів, а в забезпеченні адаптивного перерозподілу пулу білків та амінокислот з метою оптимізації метаболічних процесів [5].

Отримані експериментальні дані корелюють з вихідною гіпотезою, підтверджуючи модулюючий вплив підвищених концентрацій іонів кобальту на активність амінотрансфераз у досліджуваних тканинах *Carassius gibelio* та *Esox lucius*. При цьому було виявлено міжвидову різницю у реакції печінки, органу, що відповідає за детоксикацію, на дію кобальту. Так, у гепатоцитів карася активність АсАТ зростала на 14,5 % за впливу 0,1 мг/дм³ та на 38,2 % – за дії 0,25 мг/дм³ іонів Co²⁺ у воді. Разом з тим у печінці щуки активність цього ензиму знижувалася на 26,6 % за впливу 0,1 мг/дм³ Co²⁺ і зростала на 40,1 % за концентрації 0,25 мг/дм³ іонів металу у воді (рис. 6.1).

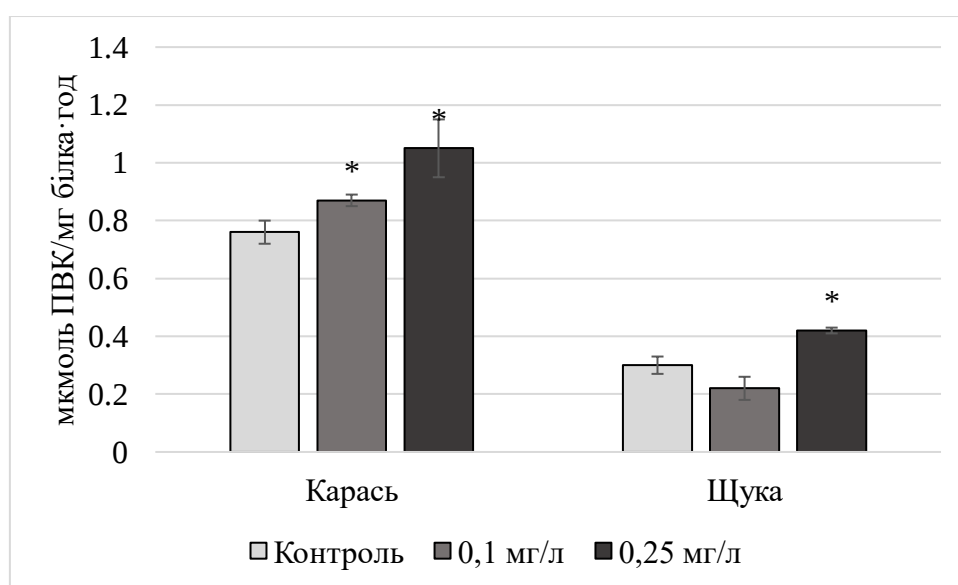


Рис. 6.1. Активність аспартатамінотрансферази у печінці карася і щуки за дії іонів Co²⁺ ($M \pm m$, $n = 5$)

Активація ферменту АсАТ є ключовою ланкою малат-аспартатного шляху, що забезпечує посилення свого функціонування у відповідь на стимуляцію фізіологічних функцій організму [176]. АсАТ, унаслідок шунтування циклу Кребса, призводить до того, що окиснюється не лимонна, а янтарна кислота. Утворений внаслідок переамінування глутамату аспартат здебільшого використовується організмом для синтезу азотовмісних сполук.

У м'язах карася активність АсАТ практично не змінюється за дії 0,1 мг/дм³ іонів металу у воді та спостерігається тенденція до зменшення активності ензиму за дії 0,25 мг/дм³ іонів кобальту (рис. 6.2). У м'язах щуки

дія обох досліджуваних концентрацій іонів кобальту було відмічене зниження активності АсАТ — на 20,5 % при 0,1 мг/дм³ та на 5,4 % — за дії 0,25 мг/дм³ іонів Co²⁺. Разом з тим, відзначено суттєво вищу активність аспартат-амінотрансферази (АсАТ) у м'язовій тканині досліджуваних видів риб порівняно з печінкою та сироваткою крові, що підкреслює важливу функціональну роль даного ферменту в метаболізмі проотеїнів риб. Зокрема, значна ферментативна активність АсАТ була виявлена у м'язах *Cyprinus carpio* за різних температурних режимів та значень рН середовища [16]. Оскільки м'язова тканина складає до 50% маси тіла кісткових риб, її потенційний вплив на запасання та перерозподіл енергетичних субстратів у цих гідробіонтів є досить значним [84].

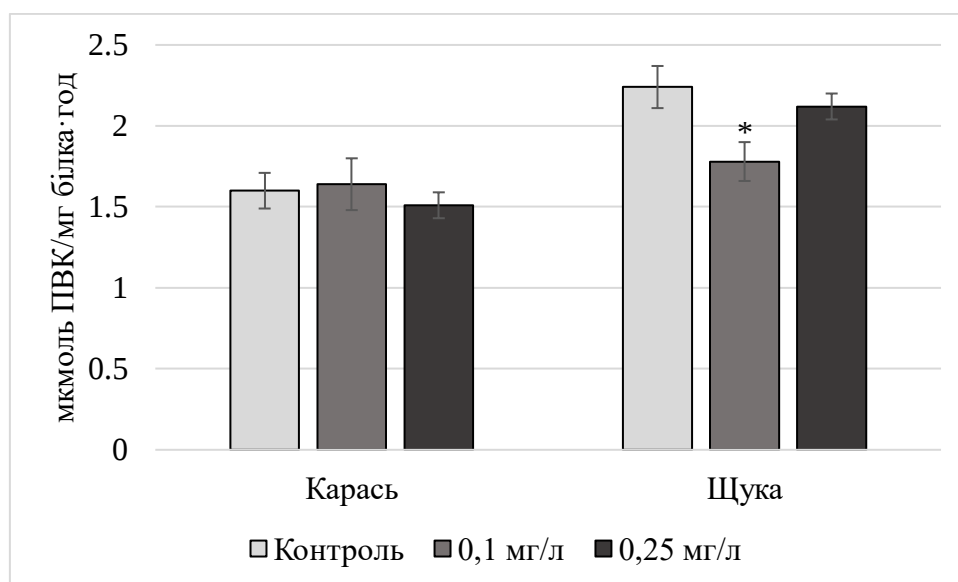


Рис. 6.2. Активність аспартатамінотрансферази у м'язах карася і щуки за дії іонів Co²⁺ ($M \pm m$, $n = 5$)

Активність АсАТ у плазмі крові *Carassius gibelio* та *Esox lucius* не виявила статистично значущих змін під впливом досліджуваних концентрацій іонів кобальту у водному середовищі (рис. 6.3). При цьому, абсолютні значення активності АсАТ у сироватці крові були значно нижчими порівняно з печінкою та м'язовою тканиною.

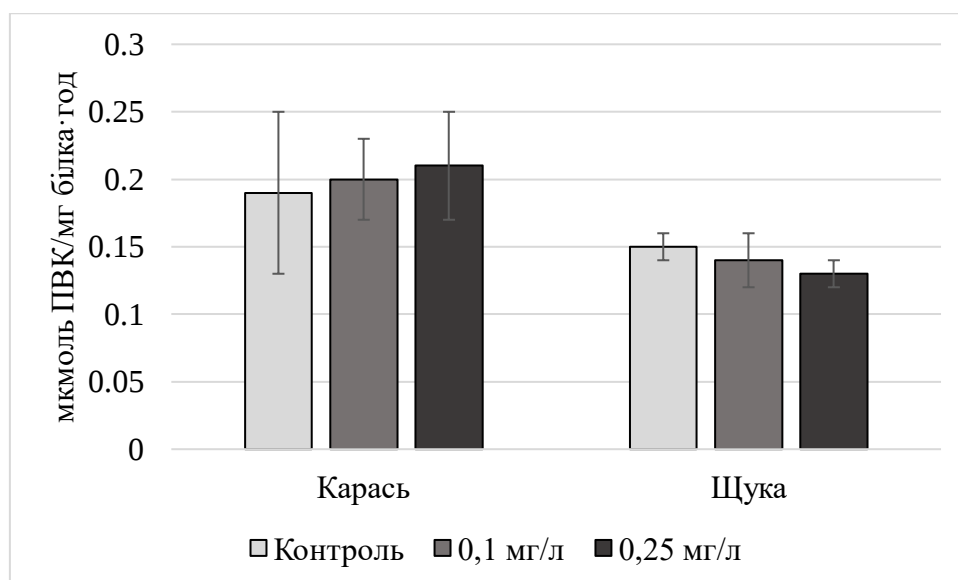


Рис. 6.3. Активність аспартатамінотрансферази у плазмі крові карася і щуки за дії іонів Co^{2+} ($M \pm m$, $n = 5$)

Одержані дані свідчать про тканинну та видову специфічність реакції систем трансамінування риб на дію іонів кобальту та її відносну незалежність від концентрації металу в оточуючому водному середовищі.

6.1.2. Активність АлАТ у тканинах риб за дії сублетальних концентрацій іонів кобальту

В організмах карася та щуки під впливом підвищених концентрацій іонів кобальту також спостерігалися зміни у функціонуванні АлАТ. Зокрема, в печінці карася дія 0,1 мг/дм³ іонів металу у воді практично не впливала на активність цього ферменту, тоді як при концентрації 0,25 мг/дм³ вона зростала на 49,1%. У печінці щуки достовірне збільшення активності АлАТ на 28,9% відзначалося лише за нижчої концентрації іонів Co^{2+} (рис. 6.4).

Отримані нами результати підтверджують значну роль печінки в азотистому обміні у риб, що корелює з наявними літературними даними [12].

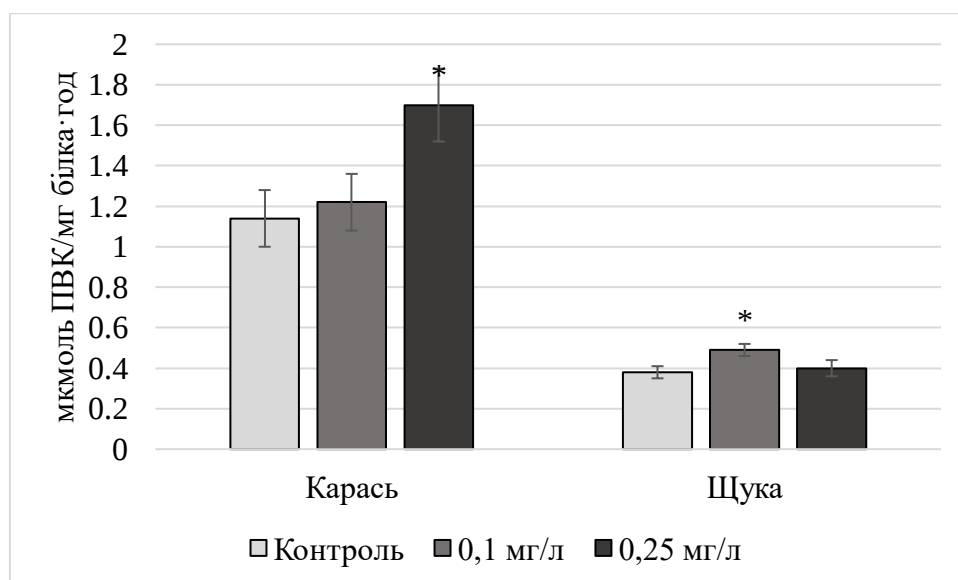


Рис. 6.4. Активність аланінамінотрансферази у печінці риб за дії іонів Co^{2+} ($M \pm m$, $n = 5$)

Зміни в активності АлАТ також були виявлені в м'язовій тканині досліджуваних видів риб (рис. 6.5). Так, у м'язах карася дія сублетальних концентрацій іонів кобальту у воді практично не вплинула на активність цього ферменту порівняно з контролем. На відміну від цього, в м'язах щуки активність АлАТ майже не змінювалася при концентрації 0,1 мг/дм³ іонів кобальту, але зростала на 11,7% при концентрації 0,25 мг/дм³ іонів металу у воді.

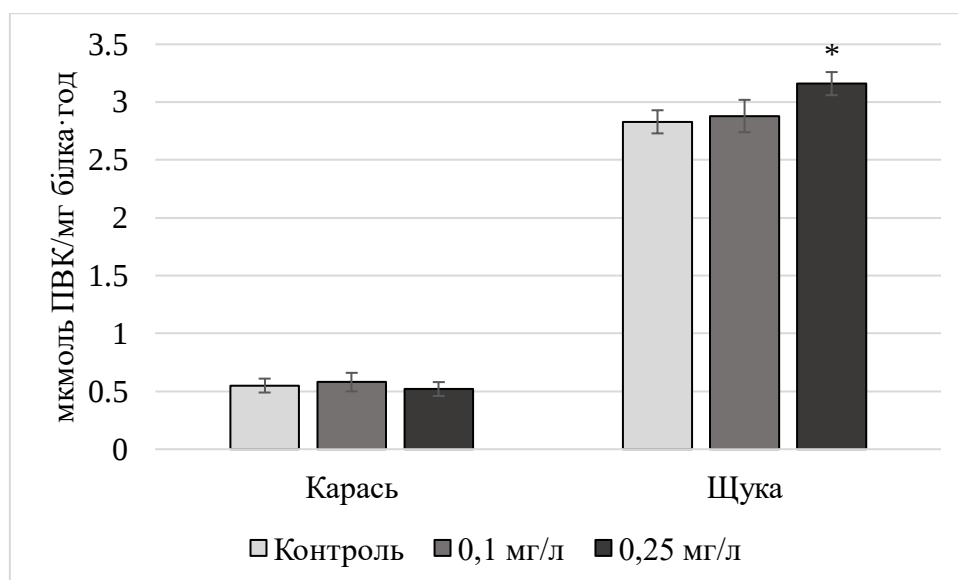


Рис. 6.5. Активність аланінамінотрансферази у м'язах риб за дії іонів Co^{2+} ($M \pm m$, $n = 5$)

Аланін утворюється в м'язах у процесі трансамінування пірувату, кінцевого продукту гліколізу, що часто активується за умов токсичного стресу. Піруват для синтезу аланіну надходить з глюкози, яка поглинається з крові або утворюється в м'язовій тканині внаслідок розпаду глікогену, а також як продукт глюкозо-аланінового циклу. З м'язів аланін транспортується кров'ю до печінки, де його вуглецевий скелет після дезамінування використовується в глюконеогенезі. Описане перетворення глюкози на аланін у м'язах і подальше перетворення аланіну назад на глюкозу в печінці відоме як глюкозо-аланіновий цикл [99]. Даний цикл активно функціонує в організмі риб при інтоксикації аміаком [2], а також за підвищених концентрацій у водному середовищі важких металів [158].

Активність АЛТ у плазмі крові досліджуваних видів риб значно нижча, ніж у печінці та м'язах (рис. 6.6). Під впливом іонів кобальту активність АЛТ у крові карася зростала на 20,1% при концентрації 0,1 мг/дм³ і знижувалася на 46,7% при концентрації 0,25 мг/дм³ іонів металу у воді.

У роботі [111] встановлено, що активність ферментів трансамінування залежить як від рівня концентрації іонів металу у водному середовищі, так і від тривалості їхнього впливу на організм риб.

Активність АЛАТ у плазмі крові щуки в 3,2 рази нижча, ніж у карася. Під впливом кобальту в концентрації 0,1 мг/дм³ спостерігалось зростання активності АЛАТ на 85,7%, тоді як при концентрації 0,25 мг/дм³ іонів Co²⁺ достовірних змін відносно контрольних значень не виявлено.

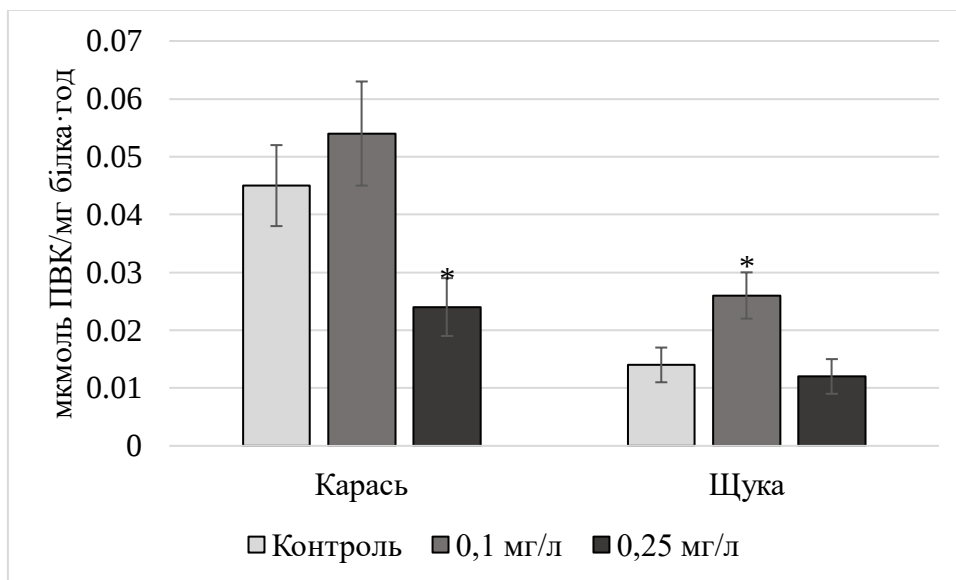


Рис. 6.6. Активність аланінамінотрансферази у плазмі крові карася і щуки за дії іонів Co²⁺ ($M \pm m$, $n = 5$)

Зважаючи на все, можна припустити, що під впливом важких металів у риб зростають енергетичні потреби, які забезпечуються за рахунок використання як глюкози, так і білків плазми крові. Так, є дані про те, що вплив сублетальних концентрацій іонів цинку (1 та 5 мг/дм³) за 96 годинної експозиції призводить до підвищення активності АЛАТ та АсАТ у сироватці крові африканського сома (*Clarias gariepinus*) [203].

Окрім визначення активності трансаміназ у тканинах досліджуваних гідробіонтів, важливим показником функціонування аланін- та аспартатамінотрансфераз у риб є їхнє співвідношення, зокрема за умов впливу іонів важких металів. Співвідношення активності АсАТ до АЛАТ, відоме як коефіцієнт де Рітіса, широко застосовується в діагностичній медицині [52].

Аналіз отриманих даних виявив, що вплив іонів кобальту в концентрації 0,1 мг/дм³ спричиняв зменшення співвідношення АсАТ/АЛАТ як у плазмі крові карася, так і щуки (рис. 6.7). Однак, збільшення концентрації іонів

металу в середовищі утримання до 0,25 мг/дм³ призводило до зростання цього показника у плазмі крові карася у 2,1 раза, тоді як у щуки співвідношення АсАТ/АлАТ поверталось до рівня контрольних значень.

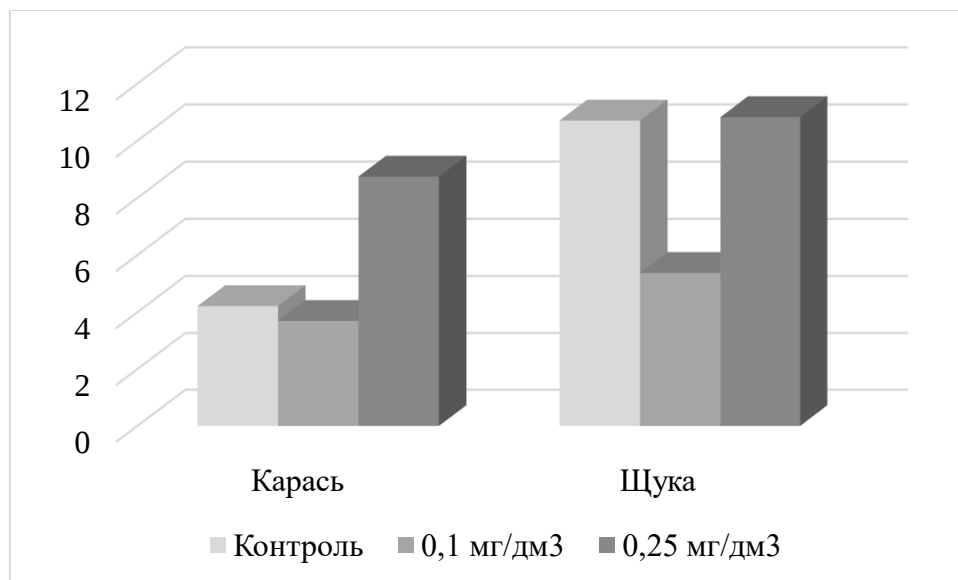


Рис. 5.7. Співвідношення активності АсАТ/АлАТ у плазмі крові риб за дії сублетальних концентрацій іонів кобальту

Цілком ймовірно, що зі збільшенням концентрації іонів металу в навколишньому середовищі зростає роль АсАТ у процесах трансамінування в крові риб. Це може бути пов'язано з впливом іонів металу на експресію відповідних генів в організмі риб. Так, дослідження методом RNA-Seq виявили значні зміни в експресії генів у печінці японської камбали під впливом нікелю та кобальту. Після 28-денної експозиції нікелем (15 мг/дм³) було ідентифіковано 184 гени з підвищеною та 185 зі зниженою регуляцією. Вплив аналогічної концентрації кобальту призвів до ще більш масштабних змін: 920 генів показали підвищену, а 457 – знижену регуляцію. Серед усіх цих диференціально експресованих генів 162 виявилися спільними для обох металів. Цікаво, що підвищені концентрації кобальту активували метаболічні шляхи, пов'язані з подовженням жирних кислот, біосинтезом стероїдів та ненасичених жирних кислот, а також процесами перекисного окиснення ліпідів [223].

Таким чином, функціонування трансаміназ є відображенням змін інтенсивності та спрямованості метаболічних процесів в організмі досліджуваних видів риб під час інтоксикації кобальтом. Отримані показники активності трансаміназ можуть слугувати індикаторами функціонального стану організму риб як у фізіологічних умовах, так і при впливі екстремальних факторів водного середовища, зокрема іонів металів.

5.2. Процеси енергозабезпечення у риб за дії сублетальних концентрацій іонів кобальту

Мітохондрії можуть стати органелами-мішенями токсичного впливу металів, коли трансмембранний потенціал знижується нижче рівня фосфорилування. Одним з основних наслідків токсичності металів є додаткові витрати енергії, а метаболічне навантаження може призвести до порушення окислювального метаболізму та посилення анаеробіозу [95].

Насьогодні недостатньо вивчені енергетичні аспекти поглинання, зв'язування та виведення металів з організму риб у залежності від їх концентрації, що вимагає подальших досліджень у цій галузі.

6.2.1. Акумуляція кобальту тканинами зябер та печінки

В ході досліджень було виявлено, що вплив 0,10 мг/дм³ кобальту за 14 денної інкубації не призводив до його акумуляції в тканинах печінки та зябер карасів (рис. 6.8).

З іншого боку, слід зауважити, що вміст кобальту в печінці риб майже вдвічі перевищував цей показник у зябрах. Таку різницю можна пояснити, по-перше, контролем поглинання кобальту, важливого біогенного елемента, через зябра карася, а по-друге, активізацією процесів виведення металу.

Засвоєння кобальту прісноводними рибами значною мірою визначається його концентрацією та рівнем іонів кальцію у водному середовищі. Крім того, молекулярні процеси, що лежать в основі поглинання кобальту рибами, залишаються маловивченими [239].

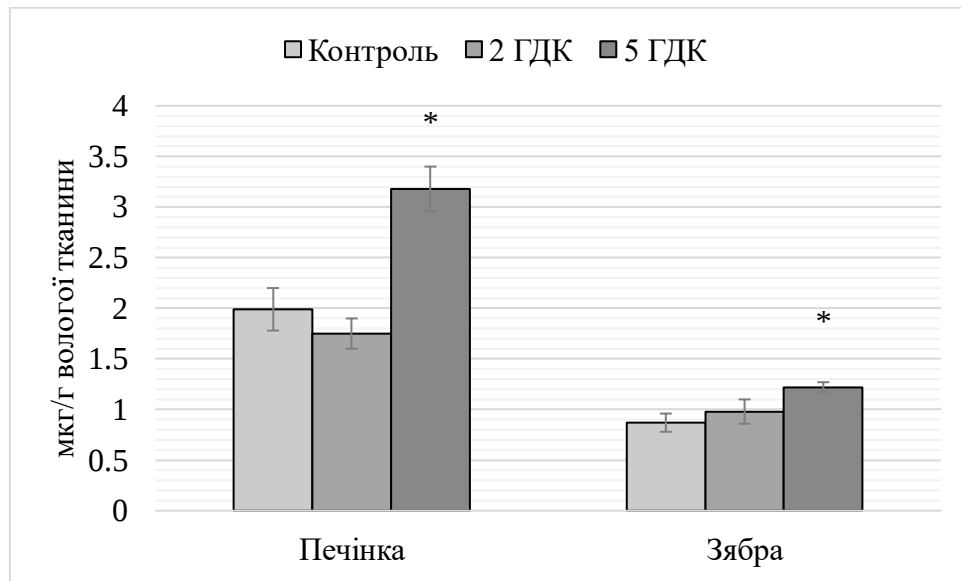


Рис. 6.8. Вплив підвищених концентрацій кобальту на його вміст у тканинах карася, мкг/г вологої тканини ($M \pm m$, $n=5$)

Разом з тим, зростання концентрації іонів кобальту у воді до $0,25 \text{ мг/дм}^3$ обумовлювало його акумулювання у обох досліджуваних тканинах карася. Так, концентрація кобальту збільшилася в 1,6 раза в печінці та в 1,4 раза в зябрах досліджуваних риб. У роботі [222] повідомляється про виражену залежність між концентрацією кобальту у воді та його накопиченням у тканинах райдужної форелі, тобто спостерігається чітка реакція організму на дозу речовини.

У тканинах щуки спостерігалася відмінна специфіка накопичення кобальту при збільшенні його концентрації у воді (рис. 6.9). Крім того, варто зазначити, що рівень цього металу в зябрах і печінці контрольної групи щук був удвічі меншим, ніж у карася. Очевидно, такі відмінності зумовлені видовими характеристиками риб та особливостями їхнього харчування.

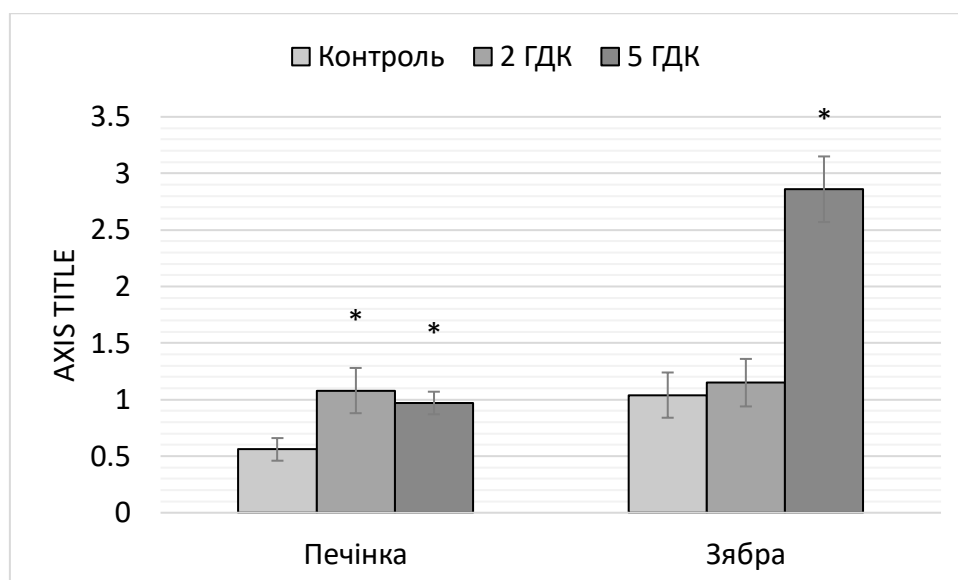


Рис. 6.9. Вплив підвищених концентрацій кобальту на його вміст у тканинах щуки, мкг/г вологої тканини ($M \pm m$, $n=5$)

У роботі [208] зазначено, що акумулювання кобальту залежить від виду риб, розмірних характеристик, метаболічної активності та концентрації металу у воді.

Аналіз отриманих даних показав, що вже при концентрації $0,1 \text{ мг/дм}^3$ кобальту, яка вдвічі перевищує гранично допустиму, спостерігалось накопичення цього металу в печінці, де його кількість збільшилася вдвічі порівняно з контрольними показниками. Подальше підвищення концентрації іонів кобальту у воді до $0,25 \text{ мг/дм}^3$ не викликало додаткового зростання його акумуляції в печінці. Навпаки, вміст кобальту дещо зменшувався порівняно з рівнем при 2 ГДК, проте так і не досяг контрольних значень.

У дослідженнях авторів [229] показано, що накопичення кобальту в *Sapoeta fusca* за впливу $6,8 \text{ мг/дм}^3$ було швидким та зростало з збільшенням часу експозиції. Методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії було встановлено, що накопичення кобальту в тканинах відбувалося в наступному порядку: печінка > м'язи > зябра > шкіра.

У зябрах щуки спостерігалось підвищення рівня кобальту під впливом обох досліджуваних концентрацій цього металу. Окремо, варто зазначити акумулювання кобальту за дії $0,25 \text{ мг/дм}^3$ його у водному середовищі. При

цьому рівень металу зростав у 2,8 рази порівняно з контрольними значеннями. Порівняння тканинної специфіки накопичення кобальту показало, що зябра та нирки можуть найбільшою мірою накопичувати цей метал, а печінка і кишківник у меншій мірі [239].

Отже, в цілому можемо зазначити, що кумулювання кобальту залежить від виду риб та є тканинспецифічним процесом. Концентрація металу виявилася більшою в печінці та зябрах карася, ніж у тканинах щуки. Найбільше накопичення металу спостерігалось при дії 0,25 мг/дм³ іонів Co^{2+} у печінці карася та зябрах щуки. Важливо підкреслити, що акумуляція кобальту рибами є активним і частково контрольованим процесом, про що свідчить відсутність накопичення кобальту в зябрах і печінці карася при низьких концентраціях іонів металу у воді.

6.2.2. Активність лактатдегідрогенази в зябрах та печінці риб за інтоксикації іонами кобальту

Виявити порушення гліколізу за дії ксенобіотиків можна, досліджуючи особливості функціонування ЛДГ у риб. В умовах токсичного стресу риби компенсують нестачу енергії за рахунок анаеробного окиснення, тому ЛДГ може слугувати біомаркером токсичної дії [190].

Збільшення активності ЛДГ свідчить про ураження тканин риб, гіпоксію та є цінним діагностичним показником у токсикології. Стресові чинники призводять до пошкодження клітин і вивільнення ЛДГ у кров [177].

Результатами дослідження виявлено, що при впливі підвищених концентрацій іонів Co^{2+} спостерігався дозозалежний характер змін активності ЛДГ у зябрах та печінці як карася, так і щуки. (рис. 6.10, 6.11).

За дії 0,1 мг/дм³ іонів кобальту відмічалася тенденція до зростання активності ензиму як у печінці, так і у зябрах карася. Вплив вищої концентрації іонів металу (0,25 мг/дм³) призводив до зростання активності ЛДГ у 2,1 та 2,0 рази у обох тканинах відповідно щодо контрольних значень.

Ймовірно, в організмі піддослідних риб відбувається активація анаеробного шляху отримання енергії, що може розглядатися як адаптивна реакція організму на токсичний вплив високих концентрацій іонів кобальту. Відомо, що значний вміст іонів кобальту у воді здатний викликати гіпоксію у риб [152].

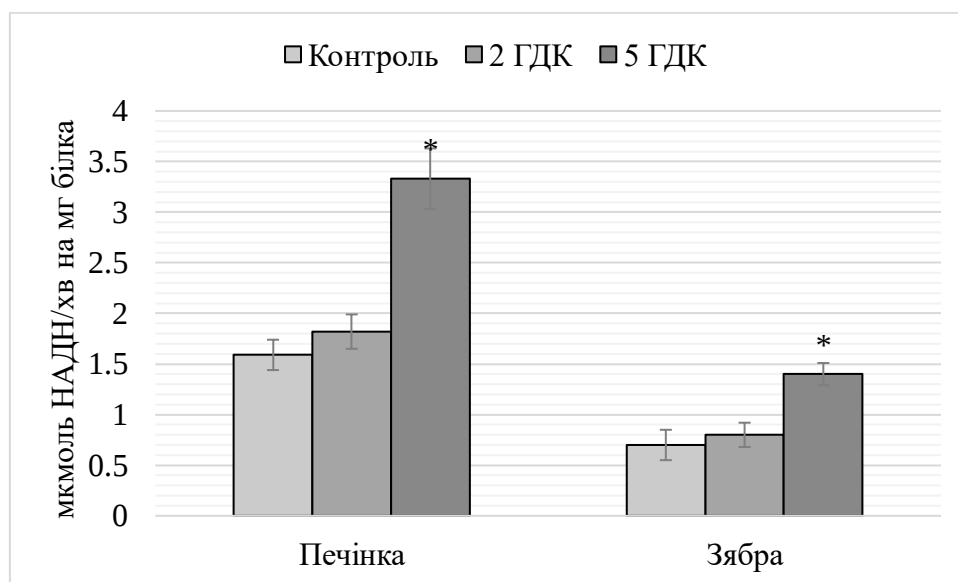


Рис. 6.10. Активність лактатдегідрогенази у тканинах карася за дії сублетальних концентрацій іонів Co^{2+} ($M \pm m$, $n=5$)

Дослідження активності ЛДГ у зябрах та печінці щуки виявило, що функціонування цього ферменту варіювалося залежно від типу тканини та концентрації іонів кобальту у воді. Подібно до тканин карася, низькі концентрації іонів металу ($0,1 \text{ мг/дм}^3$) не призводили до статистично значущих змін в активності ЛДГ.

Однак вплив іонів кобальту в концентрації $0,25 \text{ мг/дм}^3$ спричиняв зростання активності ферменту в печінці щуки в 1,4 раза, що може вказувати на активацію процесу гліколізу. Інша картина модуляції ЛДГ під дією іонів кобальту спостерігалася в тканинах зябер щуки, де активність ферменту знижувалася вдвічі порівняно з контрольними показниками ($p < 0,05$). Пригнічення ферменту кобальтом, імовірно, можна пояснити високим рівнем

його накопичення в тканинах зябер щуки (див. рис. 6.9), що може призводити до зв'язування сульфгідрильних груп ферменту [49].

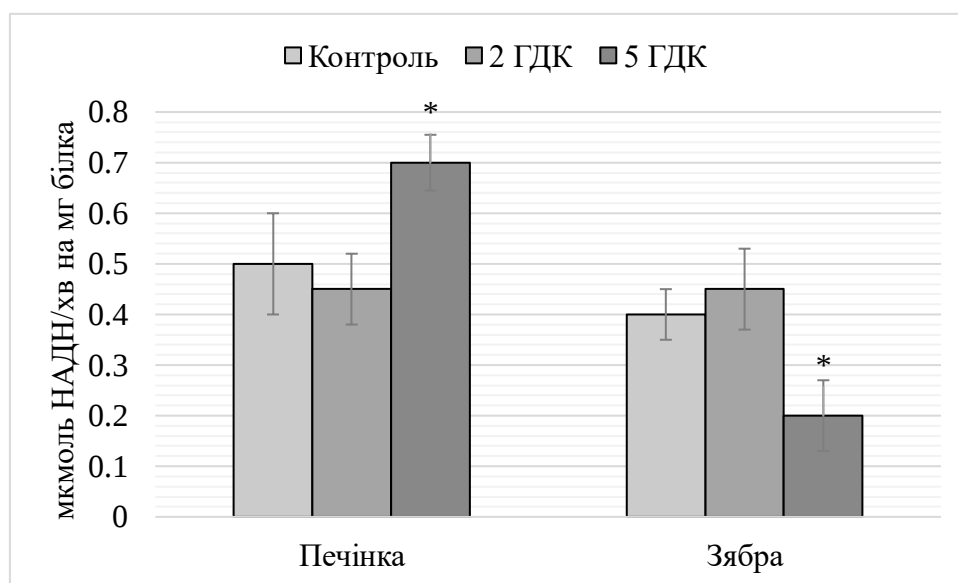


Рис. 6.11. Зміни активності лактатдегідрогенази у тканинах щуки за дії підвищених концентрацій іонів Co^{2+} ($M \pm m$, $n=5$)

Таким чином, вплив сублетальних концентрацій кобальту спричиняв різноспрямовані зміни у функціонуванні лактатдегідрогенази, які визначаються концентрацією іонів металу, видом риб та типом тканини.

6.2.3. Функціонування сукцинатдегідрогенази у тканинах карася і щуки за дії іонів Co^{2+}

Сукцинатдегідрогеназа це ключовий фермент циклу Кребса, який каталізує перетворення бурштинової кислоти на фумарову. СДГ відіграє важливу роль у координації різних метаболічних шляхів, що забезпечують енергетичний та пластичний обмін в організмі [33]. Результати токсикологічних досліджень свідчать про те, що ферменти, залучені до дихального метаболізму, зокрема СДГ, є типовою мішенню для токсичних речовин.

Проведені нами дослідження продемонстрували, що вплив іонів кобальту є різноспрямованим і залежить насамперед від рівня накопиченого

металу в тканинах, який, зі свого боку, визначається концентрацією Co^{2+} у воді.

Активність СДГ у печінці карася за дії підвищених концентрацій іонів Co^{2+} не відрізнялася від контрольних значень (рис. 6.12). Проте, відмічена тенденція до стимулювання ферментної активності печінки за дії обох концентрацій іонів кобальту, що, ймовірно, визначається фізіологічною роллю металу у функціонуванні циклу Кребса [49].

Дещо інший характер змін за інтоксикації іонами кобальту було відмічено для досліджуваного ферменту у зябрах (рис. 6.12.). В міру збільшення концентрації іонів Co^{2+} у воді зростає рівень інгібування СДГ, досягаючи максимуму за ДПІ 5 ГДК (у 2,8 разів). Інгібування ферменту можливо пов'язано з накопиченням металу у тканих зябер карася (див рис. 6.9).

У роботі [187] показано інактивацію СДГ та малатдегідрогенази у тканинах зябер та печінки коропових риб *Cirrhinus mrigala* сублетальними концентраціями хлоридів кадмію, плюмбум і ртуті протягом 3, 7, 15, 30 і 45 днів. При цьому ступінь інгібування СДГ зростав із терміном інкубації.

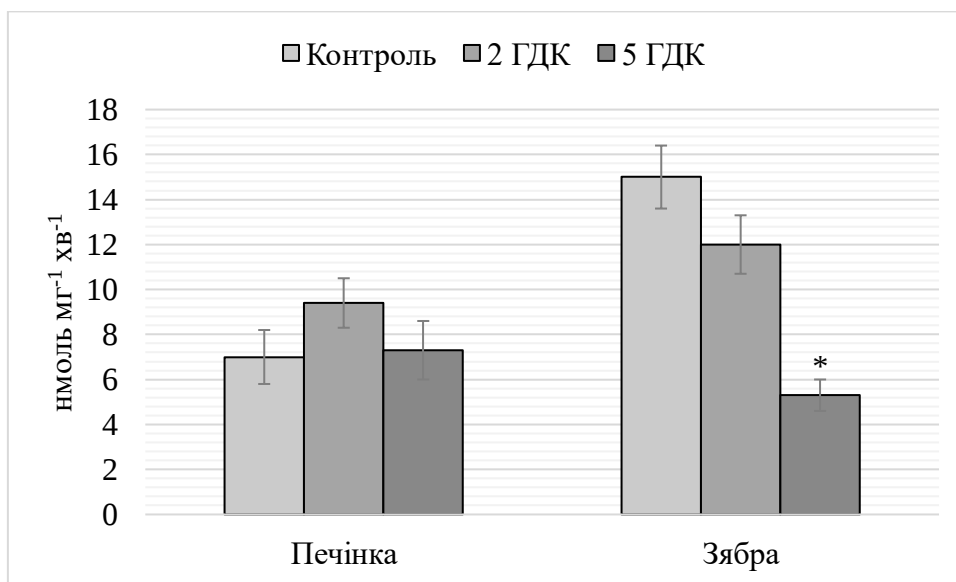


Рис. 6.12. Активність сукцинатдегідрогенази в тканинах карася за дії підвищених концентрацій іонів кобальту (нмоль сукцинату/мг білка·хв; $M \pm m$, $n=5$)

Аналіз результатів досліджень показав, що за дії іонів Co^{2+} у печінці щуки не було відмічено інгібуванням активності СДГ. Разом з тим мало місце зростання активності фермента у 1,7 рази за дії 0,1 мг/дм³ іонів кобальту, тоді як за 0,25 мг/дм³ іонів металу була відмічена лише тенденція активації СДГ (рис. 6.13). У цьому випадку спостерігається стимуляція циклу Кребса іонами Co^{2+} , що, з одного боку, може бути зумовлено безпосередньою активацією СДГ, а з іншого – збільшенням енергетичних витрат на підтримання гомеостазу кобальту в організмі щуки. Важливу роль у відсутності пригнічувального впливу, ймовірно, відіграє також регуляція надходження металу на рівні зябер апарату, завдяки чому активність СДГ не зазнає суттєвих змін [239].

Ця гіпотеза знаходить підтвердження і в тому, що в зябрах щуки, на відміну від печінки, чітко простежується залежність впливу кобальту від його концентрації: пригнічення СДГ у 1,8 раза при дії 5 ГДК іонів металу ($p < 0,05$), тоді як при концентрації 0,1 мг/дм³ іонів металу у воді статистично достовірних змін у функціонуванні ферменту не виявлено.

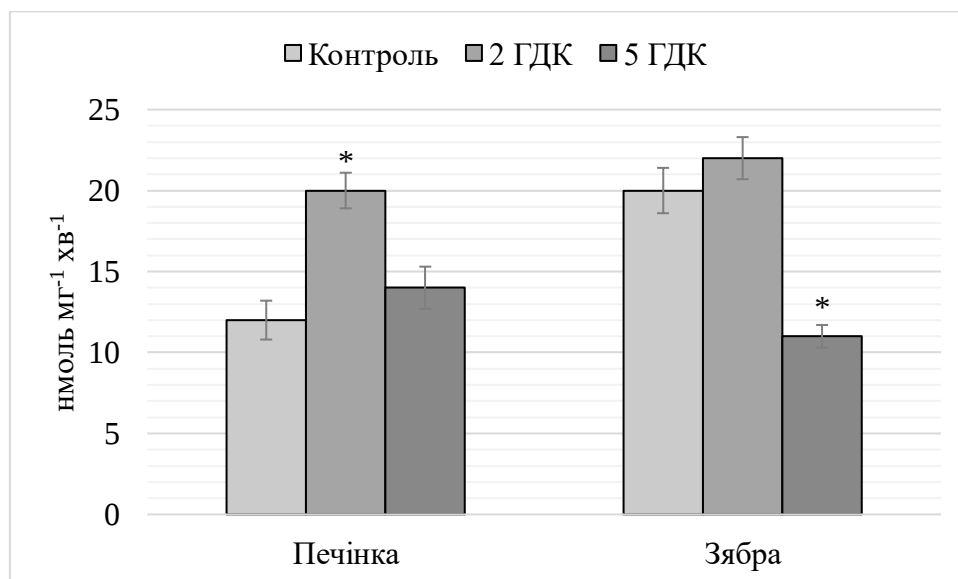
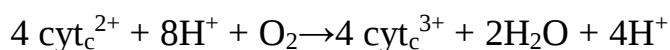


Рис. 6.13. Активність сукцинатдегідрогенази в тканинах щуки за дії підвищених концентрацій іонів кобальту (нмоль сукцинату/мг білка·хв; $M \pm m$, $n=5$)

Вплив іонів кобальту в концентрації 0,25 мг/дм³, ймовірно, спричиняє деструктивні зміни в зябрах щуки, що пов'язано зі значним накопиченням цього металу в даному органі. Відомо, що кобальт здатен порушувати процеси іонної регуляції в клітинах зябер, а його поглинання клітинами зябрового епітелію відбувається за подібним механізмом з іонами кальцію [49], через що, ймовірно, енергетичні ресурси виснажуються внаслідок структурних перебудов епітелію зябер.

6.2.4. Активність цитохромоксидази в зябрах та печінці риб за дії іонів кобальту (II)

Цитохромоксидаза є ферментом дихального ланцюга мітохондрій, який каталізує окиснення цитохрому с молекулярним киснем відповідно до реакції:



До складу цього фермента входять чотири редокс-центри: два геми (гем а та гем а₃) і два атоми міді (Cu_a та Cu_b) [237].

ЦО є ключовим ферментом у регуляції швидкості окисного фосфорилування, а також бере участь у знешкодженні активних форм кисню, забезпеченні енергією процесів транспорту, зв'язування та детоксикації важких металів в організмі тварин [239].

Аналіз отриманих результатів показав, що за дії іонів Co²⁺ відбувається інактивація ензима у печінці карася лише за дії вищої із досліджуваних концентрацій, коли активність ЦО знижувалася у 1,7 разів. Це опосередковано вказує на виснаження енергозабезпечення печінки риб за високих концентрацій іонів кобальту ((рис. 6.14).

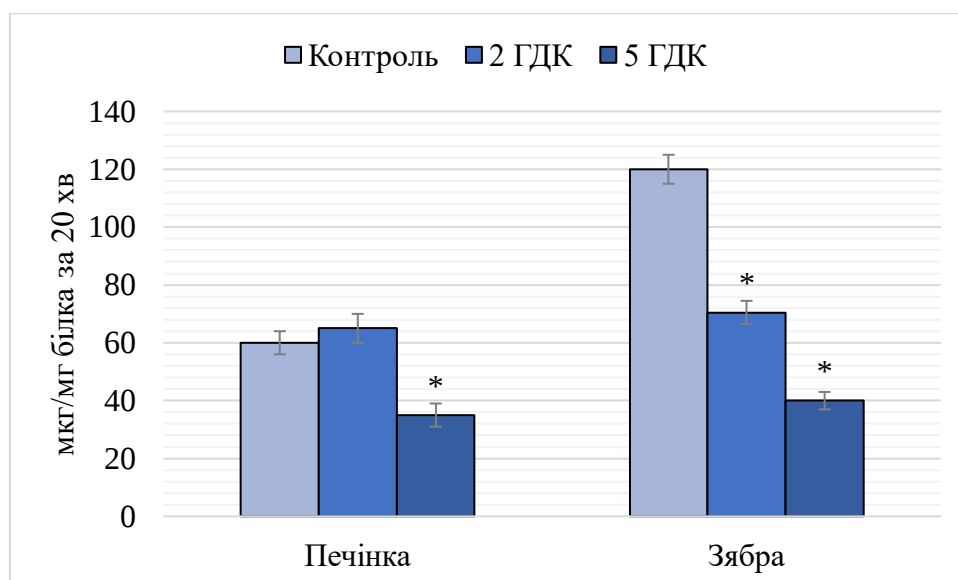


Рис. 6.14. Активність цитохромоксидази в тканинах карася за дії підвищених концентрацій іонів кобальту (мкг/мг білка за 20 хв; $M \pm m$, $n=5$)

Іони як незамінних, так і життєво необхідних металів здатні викликати суттєві метаболічні зміни в печінці риб, що, своєю чергою, призводить до порушення кінетичних характеристик ферментів, залучених до дихального метаболізму [166], чим очевидно і обумовлено інгібування кобальтом активності ЦО печінки карася.

Активність ЦО в зябрах карася перевищувала її рівень у печінці (див. рис. 6.14). Це пояснюється важливою роллю аеробного метаболізму в зябрах, де енергія переважно витрачається на підтримання іонного гомеостазу [239].

Аналіз отриманих даних продемонстрував, що іони кобальту є досить потужним інгібітором цитохромоксидази в зябрах риб. При цьому інгібування мало дозозалежний характер: при концентраціях 0,1 та 0,25 мг/дм³ активність ферменту знижувалася відповідно в 1,7 та 3 рази. ЦО є ферментом, який надзвичайно чутливий до токсикантів, у тому числі і металів, що дає можливість використання його у якості біомаркера [187].

Збій у транспортуванні електронів у мітохондріях може бути спричинений як безпосереднім порушенням дихального ланцюга, так і розладом циклу Кребса, який забезпечує відновлення NAD [57]. Дана гіпотеза підтверджується високим ступенем інгібування СДГ іонами кобальту.

У тканинах щуки характер змін ферментної активності за дії сублетальних концентрацій іонів Co^{2+} мав дещо інший характер ніж у карася (рис. 6.15.). Так, за дії обох концентрацій іонів кобальту мало місце інгібування (близько в 1,6 рази) редокс процесів в мітохондріях пов'язаних з ЦО.

Вплив іонів кобальту в концентраціях 0,1 та 0,25 мг/дм³ на зяброву тканину щуки спричиняв зниження активності цитохромоксидази в 1,45 та 1,75 раза відповідно ($p < 0,05$).

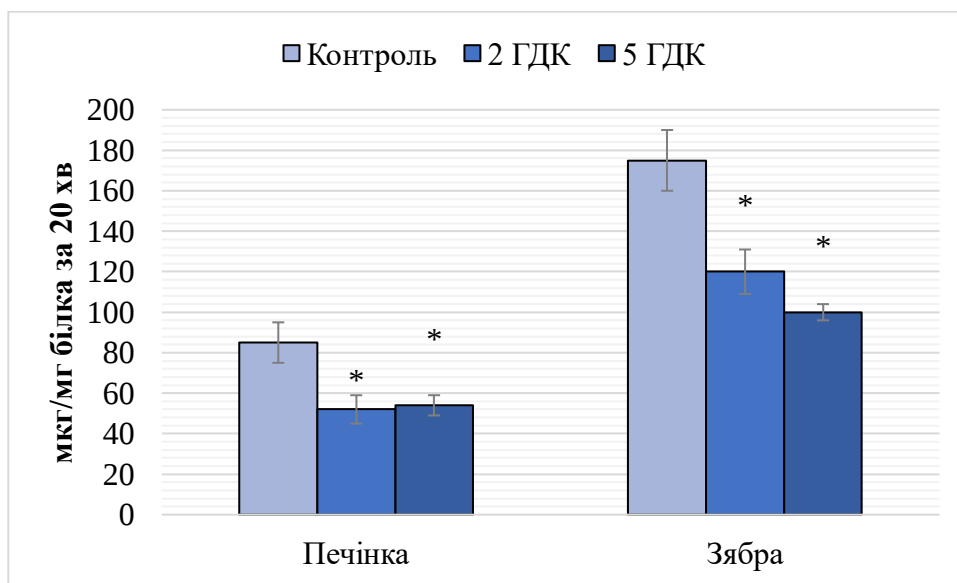


Рис. 6.15. Активність цитохромоксидази в тканинах щуки за дії підвищених концентрацій іонів кобальту (мкг/мг білка за 20 хв; $M \pm m$, $n=5$)

Це свідчить про те, що ступінь пригнічення ферменту зростає зі збільшенням концентрації металу у воді. У роботі [187] було відмічене інгібування цитохромоксидази зябер, печінки та м'язів *Cirrhinus mrigala* сублетальними концентраціями іонів важких металів з одночасною активацією гліколізу.

Висновки до розділу 6

Таким чином, іони кобальту впливають на функціонування ферментних систем тканинах риб. Важливо наголосити на тканинній та концентраційній специфіці цих змін.

Відмічене зростання активності АсАТ в печінці карася та щуки за дії сублетальних концентрацій іонів Co (II), тоді як у м'язах та плазмі

крові риб зміни у функціонування цього фермента були незначні. Щодо функціонування АЛАТ, то у карася активність фермента за концентрації 0,25 мг/дм³ іонів Co^{2+} зростала у печінці та знижувалася у плазмі крові. У щуки відмічалася активація АЛАТ у печінці та плазмі крові за дії 0,1 мг/дм³ та у м'язах за концентрації 0,25 мг/дм³ іонів металу.

Дія іонів кобальту в концентрації 0,1 мг/дм³ не викликала статистично достовірних змін активності ЛДГ у тканинах щуки та карася. Натомість, вплив 0,25 м/л іонів Co^{2+} призводив до активації ферменту в тканинах карася та печінці щуки, тоді як у зябрах щуки спостерігалось пригнічення ферментної активності ЛДГ.

Високі концентрації іонів кобальту (0,25 мг/дм³) призводили, насамперед, до змін у зябровому епітелії як карася, так і щуки на що вказує зниження активності СДГ. Ймовірно, це пов'язано з виснаженням системи аеробного енергозабезпечення. Дія 0,1 мг/дм³ іонів кобальту призводила до зростання активності ензиму у печінці риб.

Щодо функціонування ЦО, то у зябрах як карася, так і щуки спостерігалось зростання ступеня пригнічення цитохромоксидази пропорційне до концентрації металу у воді, тоді як у печінці обидві досліджувані концентрації викликали ідентичний інактиваційний ефект.

РОЗДІЛ VII. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

7.2. Інтегральна оцінка стану організму риб та навколишнього середовища на основі гематологічних показників.

Кров риб – це динамічна багатофункціональна система, яка оперативно відгукується на зміни умов водного середовища. Гематологічні показники гідробіонтів є цінними індикаторами в біомоніторингу для оцінки токсичного впливу важких металів [82, 100].

Аналіз отриманих даних показав відсутність достовірного накопичення кобальту у крові обох видів риб за інтоксикації сублетальними концентраціями іонів металу. Зміни кількості еритроцитів, гемоглобіну та значення гематокриту більшою мірою проявилися у крові щуки за вищої (0,25 мг/дм³) концентрації іонів Co^{2+} , де ці показники зростали, що робить використання цього виду риб інформативнішим у використанні для біомоніторингу забруднення водного середовища металами (табл. 7.1). Окремо слід зазначити зростання концентрації глюкози у плазмі крові обох видів риб як за впливу 0,1, так і 0,25 мг/дм³ іонів кобальту, що очевидно є ознакою стресу при металічних інтоксикаціях. Саме у процесі пристосування риб до токсичних умов існування необхідна велика кількість енергії, яка утворюється із глюкози [192].

Аналіз направленості гліколітичних та аеробних процесів показує посилення анаеробного метаболізму у риб за дії сублетальних концентрацій іонів кобальту, особливо у щуки за впливу 0,25 мг/дм³ іонів металу. Так, було відмічене зниження кількості пірувату та зростання вмісту молочної кислоти. Дані висновки підтверджуються зростанням відношення концентрації лактат/піруват та активності лактатдегідрогенази у плазмі крові риб

Щодо вмісту загального білка та фракційного складу білків плазми крові досліджуваних видів риб, то слід зазначити видовий та концентраційнозалежний характер змін цих показників. У плазмі крові карася було відмічено зростання вмісту протеїнів за дії обох концентрацій іонів

115

металу та зниження їх кількості у плазмі щуки за впливу 0,25 мг/дм³ токсиканту. Коцентрація альбуміну у плазмі крові риб не змінювалася за винятком щуки при 0,1 мг/дм³ іонів металу, де частка цієї фракції зростала. Вміст α_1 -глобулінів зростав за дії обох концентрацій іонів Co^{2+} у плазмі крові щуки та знижувався у першій дослідній групі карасів. Частки α_2 -глобулінів знижувалися у плазмі крові обох дослідних груп карасів та не змінювалися у щуки. Зміни у вмісті β -глобулінів за дії іонів металу мали різновекторний характер. Так, лише за впливу 0,1 мг/дм³ іонів кобальту було відмічено зростання частки цієї фракції у карася та зниження у щуки. Вміст γ -глобулінів у плазмі крові обох дослідних груп щуки знижувався, а карася зростав лише за 0,25 мг/дм³ іонів металу.

Таблиця 7.1

Характеристика змін гематологічних показників у карася та щуки за впливу сублетальних концентрацій іонів кобальту

серія	Co	er	heq	hb	glu	lac	pyr	prot	alb	α_1	α_2	β	γ	mda	dc	looh	KAT	SOD	LDH	AST	ALT
карась																					
0,1	↔	↑	↑	↑	↑	↑	↔	↑	↔	↓	↓	↑	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↑	↔	↔
0,25	↔	↔	↔	↑	↑	↔	↑	↑	↔	↔	↓	↔	↑	↔	↔	↔	↑	↑	↓	↔	↓
щука																					
0,1	↔	↔	↔	↔	↑	↔	↓	↔	↑	↑	↔	↓	↓	↔	↓	↑	↔	↑	↔	↔	↑
0,25	↔	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↔	↑	↔	↔	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↔	↔

Примітки: ↑ - достовірне зростання; ↓ - достовірне зниження; ↔ - відсутність достовірних змін.

У дослідженнях [100] був відмічений флуктуаційний характер змін загального білка сироватки крові, сироваткового глобуліну та альбуміну у коропів за впливу токсичних (Hg та Pb) та незамінних (Cu та Ni) солей важких металів у сублетальних концентраціях. Рівень сироваткового білка та глобуліну показав початкове різке збільшення з 2 до 20 годин, а потім зниження до 72 годин. Вміст сироваткового альбуміну показав початкове зниження з 2 до 4 годин, а потім періодичне відновлення, яке тривало протягом 72 годин. Автори пропонують використовувати вміст білка, альбуміну та глобуліну сироватки крові риб як загальних показників реакції на забруднення важкими металами.

Вплив металів здатен провокувати посилене утворення активних форм кисню в організмі, що у свою чергу, впливає на роботу ферментів, які відповідають за знешкодження АФК, таких як каталаза, глутатіонпероксидаза та супероксиддисмутаза [148].

У крові обох дослідних груп карася не було відмічене накопичення первинних та вторинних продуктів пероксидації ліпідів, що підкреслює вищу токсикорезистентність саме цього виду прісноводних риб до дії іонів металу.

Якщо проаналізувати особливості накопичення продуктів ПОЛ у крові щуки другої дослідної групи, то можна відмітити зростання концентрації ТБК активних продуктів, ДК та гідропероксидів ліпідів. Очевидно, це вказує на посилення окисного стресу, викликаного сублетальними концентраціями іонів кобальту. Індукція АФК сублетальними концентраціями кобальту підтверджується зростанням активностей каталази та супероксиддисмутази у крові обох видів риб за впливу 0,25 мг/дм³.

Для встановлення кореляційних зв'язків між гематологічними показниками було розраховано коефіцієнти кореляції Пірсона (табл. 7.2)

Таблиця 7.2

Матриця кореляцій гематологічних показників за дії підвищених концентрації іонів кобальту

	Co	Er	Heq	Hb	Glu	Lac	Pyr	Prot	Alb	α_1	α_2	β	γ	Mda	Dc	looh	KAT	SOD	LDH	AST	ALT
Co	1,00	-0,92	1,00	-0,98	-0,95	0,96	0,93	0,90	-0,88	-0,30	-0,36	-0,23	-0,99	0,50	0,84	-0,99	0,62	0,97	0,83	0,69	1,00
Er	-0,92	1,00	-0,91	0,98	0,99	-0,97	-0,72	-0,67	0,98	0,63	0,68	-0,12	0,87	-0,64	-0,96	0,96	-0,30	-0,97	-0,60	-0,49	-0,93
Heq	1,00	-0,91	1,00	-0,97	-0,95	0,96	0,94	0,91	-0,87	-0,27	-0,34	-0,25	-0,99	0,49	0,83	-0,99	0,63	0,97	0,84	0,70	1,00
Hb	-0,98	0,98	-0,97	1,00	0,99	-0,99	-0,83	-0,79	0,96	0,49	0,55	0,04	0,95	-0,59	-0,92	0,99	-0,45	-0,99	-0,71	-0,59	-0,98
Glu	-0,95	0,99	-0,95	0,99	1,00	-0,98	-0,78	-0,73	0,97	0,56	0,61	-0,04	0,91	-0,62	-0,95	0,98	-0,38	-0,99	-0,66	-0,54	-0,96
Lac	0,96	-0,97	0,96	-0,99	-0,98	1,00	0,82	0,77	-0,95	-0,49	-0,54	-0,04	-0,93	0,58	0,91	-0,98	0,44	0,98	0,70	0,58	0,97
Pyr	0,93	-0,72	0,94	-0,83	-0,78	0,82	1,00	0,99	-0,65	0,07	0,00	-0,53	-0,96	0,29	0,60	-0,88	0,84	0,83	0,93	0,80	0,92
Prot	0,90	-0,67	0,91	-0,79	-0,73	0,77	0,99	1,00	-0,59	0,15	0,08	-0,59	-0,94	0,24	0,54	-0,84	0,87	0,79	0,93	0,80	0,88
Alb	-0,88	0,98	-0,87	0,96	0,97	-0,95	-0,65	-0,59	1,00	0,70	0,74	-0,20	0,82	-0,66	-0,97	0,93	-0,21	-0,95	-0,52	-0,42	-0,89
α_1	-0,30	0,63	-0,27	0,49	0,56	-0,49	0,07	0,15	0,70	1,00	0,99	-0,77	0,19	-0,61	-0,72	0,41	0,50	-0,48	0,17	0,19	-0,32
α_2	-0,36	0,68	-0,34	0,55	0,61	-0,54	0,00	0,08	0,74	0,99	1,00	-0,73	0,25	-0,63	-0,76	0,47	0,45	-0,54	0,11	0,13	-0,38
β	-0,23	-0,12	-0,25	0,04	-0,04	-0,04	-0,53	-0,59	-0,20	-0,77	-0,73	1,00	0,32	0,31	0,24	0,12	-0,77	-0,04	-0,57	-0,52	-0,21
γ	-0,99	0,87	-0,99	0,95	0,91	-0,93	-0,96	-0,94	0,82	0,19	0,25	0,32	1,00	-0,44	-0,78	0,97	-0,69	-0,94	-0,87	-0,73	-0,99
Mda	0,50	-0,64	0,49	-0,59	-0,62	0,58	0,29	0,24	-0,66	-0,61	-0,63	0,31	-0,44	1,00	0,66	-0,55	-0,04	0,58	0,20	0,15	0,51
Dc	0,84	-0,96	0,83	-0,92	-0,95	0,91	0,60	0,54	-0,97	-0,72	-0,76	0,24	-0,78	0,66	1,00	-0,89	0,16	0,92	0,47	0,38	0,85
looh	-0,99	0,96	-0,99	0,99	0,98	-0,98	-0,88	-0,84	0,93	0,41	0,47	0,12	0,97	-0,55	-0,89	1,00	-0,53	-0,99	-0,76	-0,64	-0,99
KAT	0,62	-0,30	0,63	-0,45	-0,38	0,44	0,84	0,87	-0,21	0,50	0,45	-0,77	-0,69	-0,04	0,16	-0,53	1,00	0,45	0,83	0,72	0,60
SOD	0,97	-0,97	0,97	-0,99	-0,99	0,98	0,83	0,79	-0,95	-0,48	-0,54	-0,04	-0,94	0,58	0,92	-0,99	0,45	1,00	0,71	0,59	0,97
LDH	0,83	-0,60	0,84	-0,71	-0,66	0,70	0,93	0,93	-0,52	0,17	0,11	-0,57	-0,87	0,20	0,47	-0,76	0,83	0,71	1,00	0,75	0,81
AST	0,69	-0,49	0,70	-0,59	-0,54	0,58	0,80	0,80	-0,42	0,19	0,13	-0,52	-0,73	0,15	0,38	-0,64	0,72	0,59	0,75	1,00	0,68
ALT	1,00	-0,93	1,00	-0,98	-0,96	0,97	0,92	0,88	-0,89	-0,32	-0,38	-0,21	-0,99	0,51	0,85	-0,99	0,60	0,97	0,81	0,68	1,00

З метою редукції даних та визначення біомаркерів крові риб, які б найбільш інформативно описували забруднення води іонами кобальту було застосовано факторний аналіз (метод головних компонент). Було виявлено два фактори, які описували близько 93,3 сумарної варіації (рис. 7.1).

Value	Eigenvalues (гематологія) Extraction: Principal components			
	Eigenvalue	% Total variance	Cumulative Eigenvalue	Cumulative %
1	14,84555	70,69308	14,84555	70,69308
2	4,74256	22,58364	19,58811	93,27671

Рис.7.1. Власні значення факторів

Факторний аналіз дозволив визначити мінімальний набір показників, які б у цілому найповніше відображали реакцію риб на водні інтоксикації сублетальними концентраціями іонів кобальту (рис. 7.2). Ми враховували показники значення, яких були $> 0,6$. Перший фактор включав насамперед показники, які відображають переважання енергетичного метаболізму (аеробний – анаеробний). Сюди ввійшли показники показники крові обох видів риб: ЛДГ, загального вмісту білка, АЛАТ, АсАТ, концентрація пірувату. Другий фактор включив здебільшого показники окисного стресу стресу риб: концентрація ДК та МДА, активність СОД.

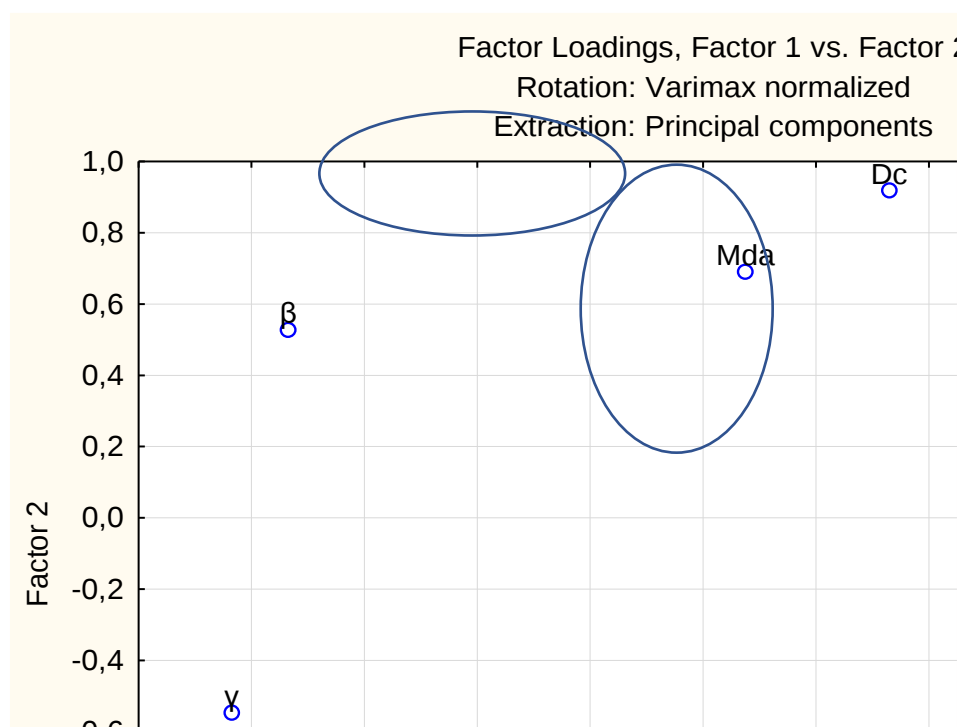


Рис 7.2. Факторні навантаження

Отже, використання цього мінімального набору неспецифічних маркерів може бути використано для оцінки стану організму риб та рівня забруднення водного середовища металами.

7.2. Акмулювання металу тканинами риб як чинник токсичності

Для виживання цих гідробіонтів критично важливим є підтримання гомеостазу та оптимального рівня метаболічних процесів в їхніх органах і системах. Токсичний потенціал металів щодо риб чато корелює з кількістю накопиченого металу в метаболічно активних тканинах, а також залежить від фізико-хімічних властивостей самого металу та його біологічної ролі [158].

З огляду на це, актуальним є проведення досліджень, спрямованих на з'ясування впливу акумуляції металів у тканинах, спричиненої водними інтоксикаціями, на їх метаболічну активність. Конкретним завданням є встановлення взаємозв'язку між концентрацією металів у зябрах і печінці та активністю ключових ферментів енергетичного обміну, таких як лактатдегідрогеназа, сукцинатдегідрогеназа і цитохромоксидаза.

Аналіз отриманих нами даних виявив, що печінка карася має високу спорідненість до іонів кобальту, що узгоджується з попередніми дослідженнями авторів [122, 175]. Коли концентрація кобальту у воді зростала до 0,25 мг/дм³, це призводило до значного накопичення кобальту в клітинах печінки карася (гепатоцитах). Це, своєю чергою, активувало лактатдегідрогеназу та інгібувало цитохромоксидазу – кінцевий фермент дихального ланцюга мітохондрій (рис. 7.3). Цікаво, що при дії 0,1 моль/л іонів кобальту накопичення цього металу в печінці карася не спостерігалось, проте активність цитохром с оксидази все одно знижувалася. Активність ферментів вважається чутливими біохімічними показниками ще до виникнення небезпечних ефектів у риб і є важливими параметрами для тестування води на наявність токсикантів [37].

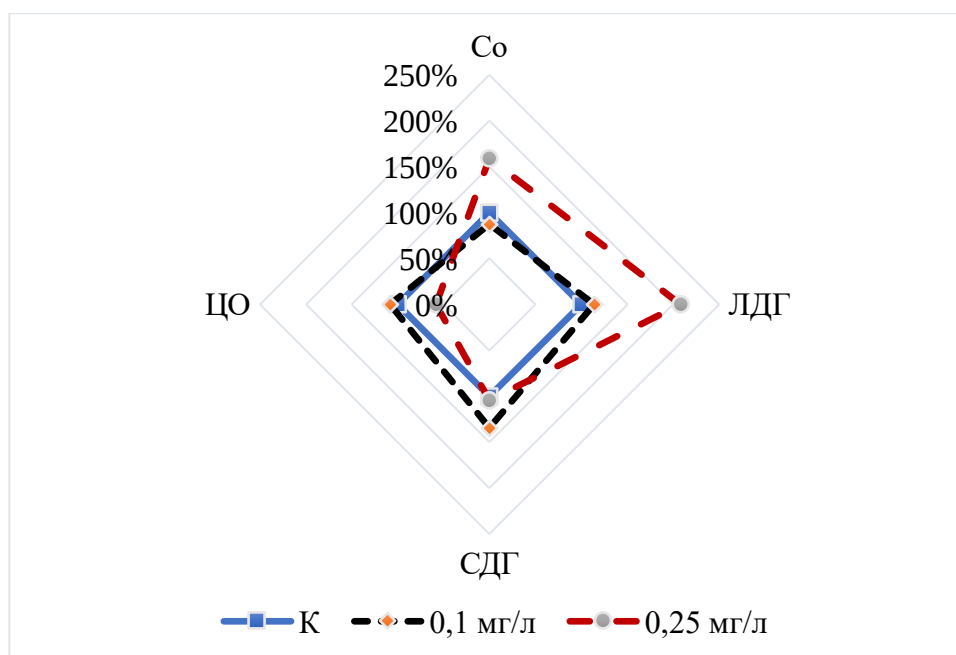


Рис. 7.3. Взаємозв'язок між активністю ензимів та акумулюванням кобальту в печінці карася (у %).

Накопичення металів, особливо в забруднених екосистемах, найчастіше відбувається в зябрах, оскільки вони безпосередньо контактують із зовнішнім водним середовищем [62]. Однак, навіть при концентрації іонів кобальту, що вдвічі перевищує гранично допустиму концентрацію, накопичення металу не спостерігалось (рис. 7.4) Лише при п'ятикратному перевищенні ГДК його вміст у зябрах зростав у 1,4 рази. Водночас було зафіксовано збільшення активності ЛДГ та інгібування ферментів аеробного обміну ЦО та СДГ.

Отже, модуляції активності ключових ферментів енергетичного обміну у карася може відбуватися за невисоких концентрацій кобальту у воді та за незначного рівня акумулювання металу в печінці та зябрах. Водночас зміни у функціонуванні ферментів можуть опосередковано відображати стан енергетичного метаболізму у прісноводних риб за інтоксикації іонами кобальту.

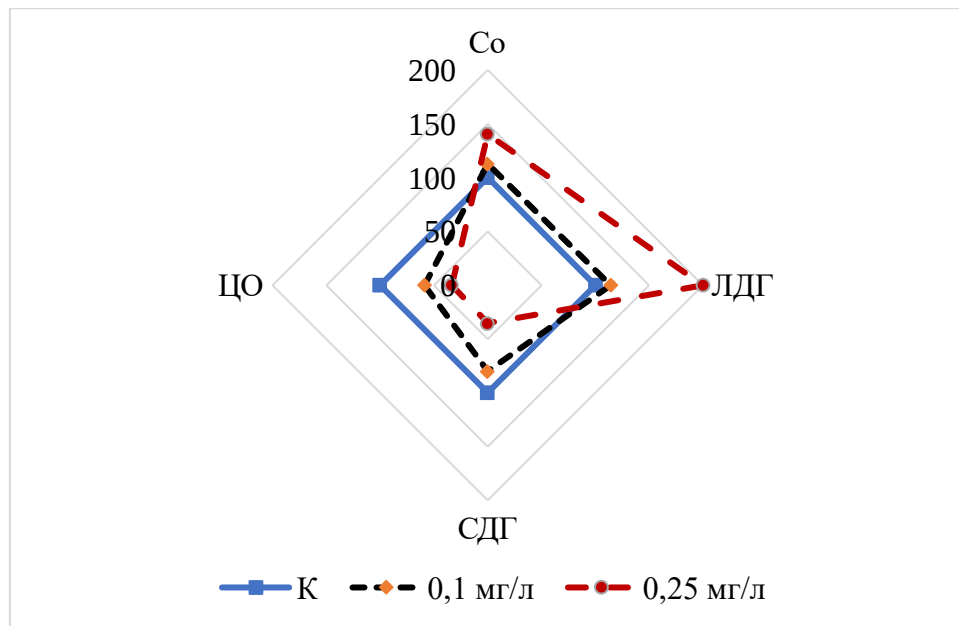


Рис. 7.4. Взаємозв'язок між активністю ензимів та акумулюванням кобальту в зябрах карася (у %).

Дослідження показали, що навіть низька концентрація кобальту (0.1 мг/дм³) у воді призводить до значного накопичення цього металу в печінці щуки (рис. 7.5).

При цьому спостерігається активація ферментів енергетичного обміну, таких як ЛДГ та СДГ. Це може свідчити про те, що організм щуки намагається компенсувати підвищене навантаження, збільшуючи витрати енергії. Ймовірно, ця енергія йде на підтримання внутрішнього балансу (іонного гомеостазу) та на зв'язування і виведення надлишку кобальту.

Однак, при вищих концентраціях кобальту (0,25 мг/дм³) ситуація змінюється. Подальше накопичення металу супроводжується значним зниженням активності ключових ферментів енергетичного обміну, таких як ЦО та СДГ. Це вказує на виснаження енергетичних ресурсів організму.

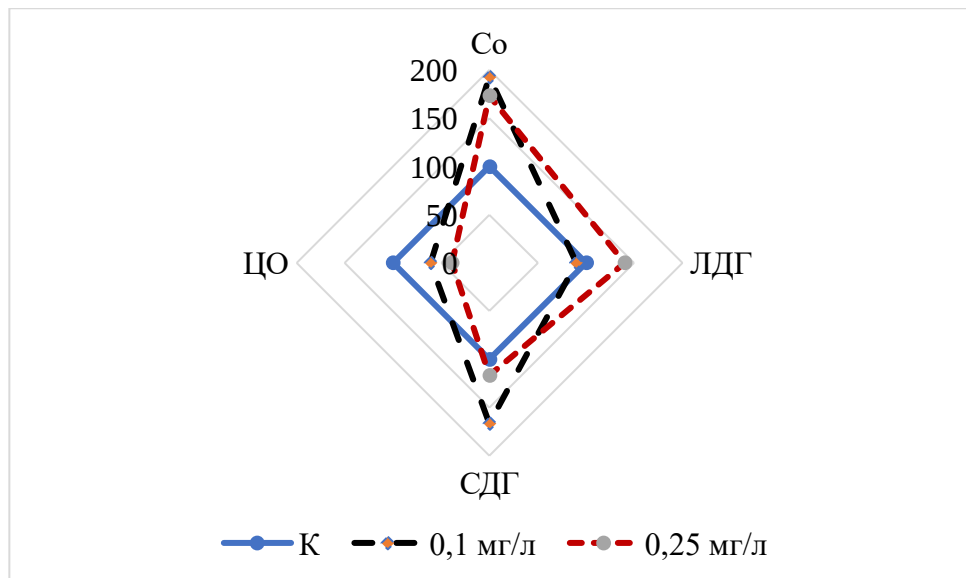


Рис. 7.5. Взаємозв'язок між активністю ферментів та акумулюванням кобальту у печінці щуки (у %).

Очевидно така тенденція детермінується перевищенням границі адаптаційного резерву організму щуки щодо підтримання гомеостазу кобальту.

В роботі автори [119] вивчали вплив сублетальних доз металів (міді, кадмію, цинку) та їхніх сумішей на активність ключових дихальних ферментів – СДГ і гліцеральдегіддегідрогенази (ГАДГ) у тканинах прісноводних риб *Oreochromis mossambicus*.

Було виявлено значне зниження активності СДГ одночасно зі зростанням активності ГАДГ у печінці, мозку, м'язах і зябрах риб, що піддавалися впливу металів. На думку авторів, це свідчить про зміщення метаболізму від аеробного до анаеробного.

Під час вивчення взаємозв'язку між активністю ферментів у зябрах щуки та накопиченням кобальту, було виявлено, що значне накопичення металу відбувалося лише під впливом 0,25 іонів Co^{2+} (рис. 7.6). Це призвело до зниження активності як лактатдегідрогенази, так і сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази.

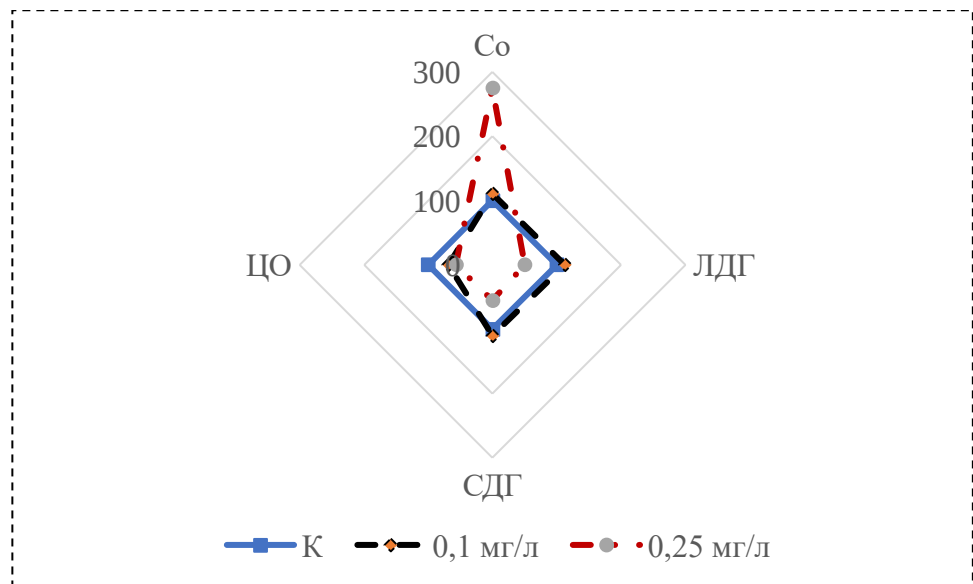


Рис. 7.6. Взаємозв'язок між активністю ферментів та акумулюванням кобальту у зябрах щуки (у %).

У дослідженнях авторів [198] показано вплив сульфату міді на ферменти СДГ та ЛДГ в мозку, зябрах, печінці риби *Catla catla*. Встановлено, що рівень СДГ знижується, а ЛДГ зростає в цих тканинах, що може бути свідченням негативного впливу металу на енергетичні процеси та метаболізм у цих органах риби. Зміна активності цих ферментів може бути використана як показник токсичності металів.

Загалом, накопичення кобальту в тканинах риб корелює з активністю ферментів енергетичного обміну. Як правило, надмірне накопичення металу призводило до активації лактатдегідрогенази та інгібування цитохромоксидази й сукцинатдегідрогенази.

У зябрах щуки, особливо сильно інгібувалися ферменти циклу трикарбонових кислот та дихального ланцюга мітохондрій, при тому в цьому органі також накопичувався кобальт.

Щодо систем переамінування у тканинах печінки та м'язів риб, то слід зазначити, що їх функціонування залежить, насамперед, від кількості накопиченого металу (рис. 7.7). Разом з тим вміст металу у тканинах карася та щуки визначався видовою специфікою риб та концентрацією металу у

середовищі. Було відмічене зниження на 22 % кількості акумульованого металу у печінці карася за дії 0,1 мг/дм³ та зростання даного показника на 59 % за 0,25 мг/дм³ іонів кобальту у середовищі інкубації. У печінці щуки кількість кобальту зростала за обох концентрацій металу (на 92 та 73 % відповідно).

У м'язах риб вміст кобальту зростав пропорційно концентрації іонів металу у воді (на 4 і 26 % у карася та на 12 і 25 % у щуки). Зміни активності ферментів мали виражений концентраційно залежний та видоспецифічний характер. Активність ензимів у тканинах карася зростала за дії 0,1 мг/дм³ іонів кобальту, тоді як за дії вищої концентрації іонів була відмічена активація АсАТ і АлАТ у печінці та тенденція до інактивації цих ферментів у м'язах.

У щуки спостерігалось зниження активності АсАТ та зростання ферментної активності АлАТ у обох тканинах за дії 0,1 мг/дм³ іонів. За впливу 0,25 мг/дм³ іонів кобальту було відмічено зростання ферментної активності АсАТ і АлАТ у обох тканинах, за винятком АлАТ у тканині печінки, де активність фермента знижувалася на 24 %.

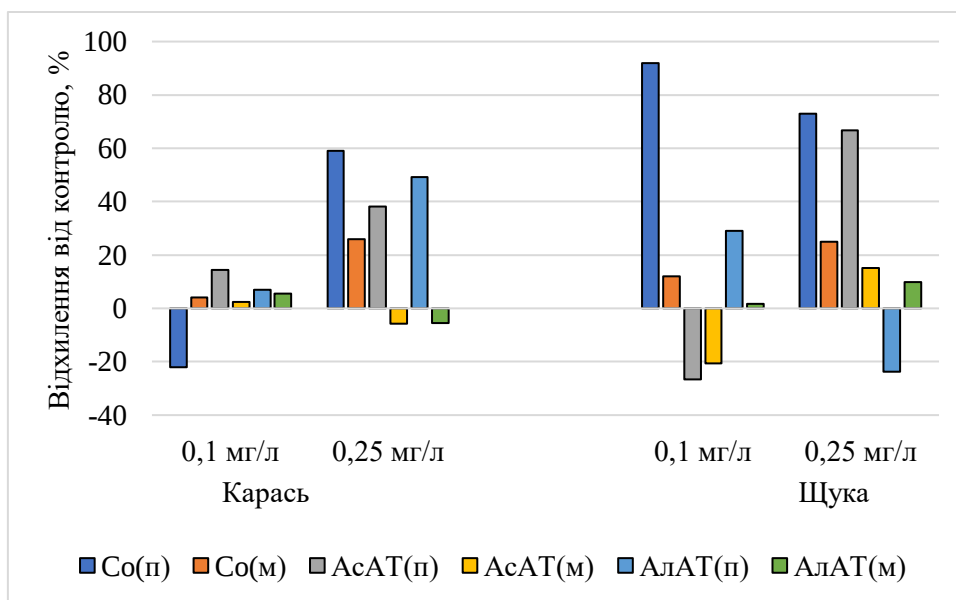


Рис. 7.7. Зміни вмісту кобальту та активностей ензимів трансамінування у тканинах печінки та м'язів прісноводних риб за дії сублетальних концентрацій іонів Co²⁺ (відхилення від контролю, %)

Отже, більш вища концентрація кобальту призводила до суттєвіших за амплітудою відхилень від контролю у активності ферментів як у тканинах карася, так і щуки.

В загальному зміни в організмі досліджених видів риби за впливу підвищених концентрацій кобальту у воді показано на рис. 7.8. Потрапляючи через епітеліальні структури шкіри та зябер у кров метал зв'язується з білками та низькомолекулярними лігандами, змінює співвідношення формених елементів, концентрацію білків та їх фракцій, низки метаболітів крові (глюкози, лактату, пірувату). Ці зміни насамперед визначаються адаптаційним потенціалом риби та концентрацією металу у водному середовищі. За дії вищої концентрації металу організм щуки зазнає окисного стресу та посилення анаеробного дихання, що підтверджується зростанням у крові концентрації продуктів ПОЛ (ТБК-АП, ДК, ГПЛ), лактату та активності ЛДГ. У обох видів риби відмічається тенденція до активації ферментів антиоксидантного захисту (SOD, KAT).

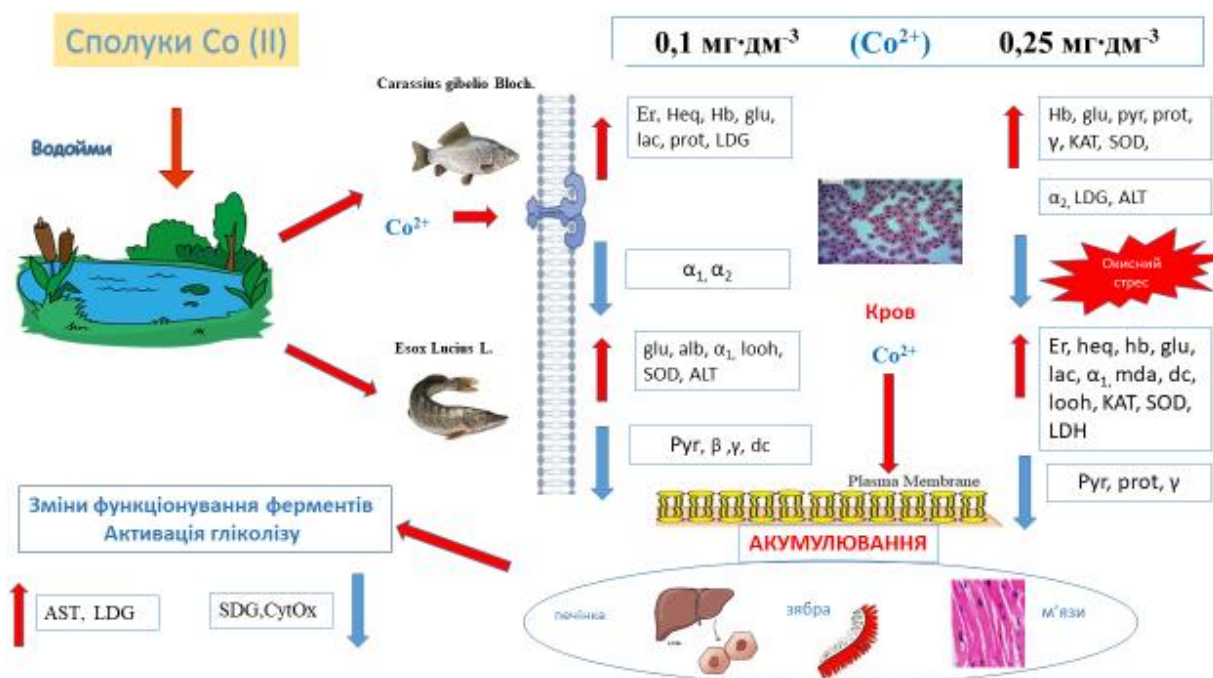


Рис. 7.8. Схема метаболічних змін в організмі прісноводних риби за дії сублетальних концентрацій кобальту

З током крові кобальт транспортується до інших органів, що обумовлює акумулювання металу у печінці, зябрах, м'язах та ін. Значне накопичення металу у тканинах риб, що спостерігається наперед за $0,25 \text{ мг/дм}^3$, призводить до порушення функціонування ферментних систем трансамінування (АлАТ, АсАТ) та енергетичного забезпечення (ЛДГ, СДГ, ЦО). При цьому має місце зростання активності ЛДГ та інактивація СДГ, ЦО у тканинах риб що, очевидно, є наслідком гіпоксії. Активація АсАТ забезпечує мобілізацію білкових ресурсів для адаптації до водної інтоксикації кобальтом.

ВИСНОВКИ

- У дисертаційній роботі досліджено морфологічні та біохімічні показники в організмі карася сріблястого (*Carassius gibelio* Bloch.) та щуки звичайної (*Esox lucius* L.) за дії сублетальних концентрацій іонів Co^{2+} у воді (0,1 та 0,25 мг/дм³) протягом 14 діб.
1. Вплив сублетальних концентрацій іонів кобальту незначно змінював розмірні характеристики риб, проте, варіації основних індексів у поєднанні з біохімічними показниками, можуть використовуватися для оцінки стану організму риб.
 2. У крові обох видів риб за інтоксикації сублетальними концентраціями іонів кобальту не було відмічено накопичення металу. У карася було відмічене зростання кількості еритроцитів, гемоглобіну та значення гематокриту за концентрації 0,1 мг/дм³ іонів кобальту, в той час як у щуки відмічалися аналогічні зміни за дії вищої концентрації іонів Co^{2+} (0,25 мг/дм³).
 3. Вплив як 0,1 мг/ дм³, так і 0,25 мг/ дм³ кобальту на риб викликає гіперглікемію у обох видів. Кількість лактату у плазмі крові карася підвищується за обох концентрацій кобальту, тоді як у щуки — лише за 0,25 мг/дм³. Кількість пірувату у карася зростає за 0,25 мг/дм³ іонів Co^{2+} , а у щуки — зменшується пропорційно до концентрації металу. Встановлено прямий зв'язок між співвідношенням лактат/піруват та активністю лактатдегідрогенази.
 4. Загальний вміст білків у плазмі крові карася зростав при дії 0,1 та 0,25 мг/дм³ іонів кобальту відповідно. Натомість у щуки цей показник знижувався лише при вищій концентрації кобальту (0,25 мг/дм³). Дія 0,1 мг/дм³ кобальту призводила до зменшення часток α_1 і α_2 -глобулінів та зростання вмісту β -глобулінів. У щуки за 0,1 мг/дм³ кобальту відзначено зростання вмісту альбуміну та α_2 -глобулінів, а також зниження часток β - та γ -глобулінів. Концентрація кобальту 0,25 мг/дм³ призвела до збільшення вмісту β -глобулінів та зниження γ -глобулінів у плазмі крові щуки.
 5. Підвищені концентрації іонів кобальту викликали накопичення продуктів ПОЛ у крові щуки, тоді як у карася достовірних змін відмічено не було. Вища із досліджуваних концентрацій іонів металу (0,25 мг/дм³) індукувала перекисне окиснення ліпідів у крові щуки, про що свідчило зростання

рівня ТБК-активних продуктів, дієнових кон'югатів та гідропероксидів ліпідів.

6. Високі концентрації іонів кобальту у воді (0,25 мг/дм³) проявляли прооксидантну дію на організм риб, про що свідчить зростання активності ферментів антиоксидантного захисту в крові риб.
7. Вміст кобальту був найвищим у печінці карася, тоді як максимальна його кількість акумулювалася за дії 0,25 мг/дм³ іонів Co^{2+} у печінці карася та зябрах щуки.
8. Зміни у функціонуванні ферментних систем риб за інтоксикації іонами кобальту були спрямовані, насамперед, для забезпечення енергетичної та пластичної адаптації до стресового впливу токсиканта. Спостерігалось зростання активності аспартатамінотрансферази у печінці обох видів риб при дії сублетальних концентрацій кобальту. У карася при концентрації 0,25 мг/дм³ кобальту активність аланінамінотрансферази зростала у печінці, але знижувалася у плазмі крові. У щуки відзначалася активація АлАТ у печінці та плазмі крові при 0,1 мг/дм³ кобальту, а також у м'язах при 0,25 мг/дм³.
9. Вплив 0,1 мг/дм³ іонів кобальту не викликав достовірних змін активності лактатдегідрогенази у тканинах риб, тоді як дія 0,25 мг/дм³ іонів Co^{2+} призводила до активації ензиму у обох тканинах карася та печінці щуки. Високі концентрації іонів кобальту (0,25 мг/дм³) призводили до зниження активності сукцинатдегідрогенази у зябрах та печінці обох видів риб.
10. У зябрах риб був відмічений пропорційний до кількості металу у воді ступінь інгібування цитохромоксидази, тоді як у печінці обидві концентрації створювали однаковий інактиваційний ефект. Акумулювання металу призводило до активації лактатдегідрогенази, тоді як цитохромоксидаза та сукцинатдегідрогеназа інгібувалися.
11. Зміни морфометричних та гематологічних параметрів, показників активності досліджених ензимів є інформативними маркерами стану організму за впливу підвищених концентрацій іонів важких металів, зокрема кобальту. Вони можуть характеризувати ступінь витривалості риб до забруднення та бути використані для прогнозування змін у водних біоценозах, забруднених важкими металами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Грициняк І.І., Фріштак О.М., Пірус Р.І. та ін. Вплив хлористого кобальту на ріст і фізіолого-біохімічні показники дволіток коропа. *Наук. вісн. ЛНУВМБТ ім. С.З. Гжицького*. 2012. Т. 14, № 3 (53) Ч. 2. С. 59—62.
2. Грубінко В.В., Арсан О.М. Роль глюкозо-аланінового циклу в адаптації риб до аміаку. *Доп. Нац. акад. наук Укр.* 1995. Сер. Б, № 1. С. 102—105.
3. ДСТУ ISO 11885:2005 Якість води. Визначення 33 елементів методом атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно-зв'язаною плазмою. Київ : Держспоживстандарт України, 2007. 13 с.
4. Дудник С.В., Євтушенко М.Ю. Водна токсикологія: основні теоретичні положення та їхнє практичне застосування. Київ: Український фітосоціологічний центр, 2013. 295 с.
5. Курант В.З. Роль білкового обміну в адаптації риб до дії іонів важких металів. Автореф. дис. ... докт. біол. наук. Київ, 2003. 38 с.
6. Марків В.С., Хоменчук В.О., Курант В.З. Накопичення кобальту в організмі прісноводних риб за його підвищеного вмісту у воді. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2023. №6. С. 78-82.
7. Марченко М. М., Копильчук Г. П., Волощук О. М. Активність ферментів енергозабезпечення карциноми Герена, трансплантованої на фоні попереднього опромінення малими дозами. *Доповіді Національної академії наук України*. 2011. № 1. С. 153-156.
URL: <http://jnas.nbu.gov.ua/article/UJRN-0000110595>
8. Методи іхтіологічних досліджень: навчальний посібник. Пилипенко Ю.В. та ін. Херсон, 2017. 432 с.
9. Неменова Ю.М. Методи лабораторних клінічних досліджень. Київ : Вища шк., 1976. 405 с.
10. Про деякі питання діяльності Комітету з питань етики (біоетики) : наказ від 19.11.2012 р. № 1287.
URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v1287736-12#Text>.

11. Романенко В. Д. Основи гідроекології. К.: Обереги, 2001. 728 с.
12. Романенко В.Д. Печень и регуляция межуточного обмена (млекопитающие и рыбы). Киев : Наук. думка, 1978. 183 с.
13. Солопова Х.Я. Стан антиоксидантної й імунної систем у короїв, уражених аеромонозом і сапролегніозом, та їх лікування: дис. ... канд. вет. наук: 03.00.04. Львів. 2021. 200 с.
14. Хоменчук В.О. Біохімічні особливості проникнення і розподілу деяких важких металів в організмі коропа лускатого : автореф. дис. ... канд. біол. наук. Львів, 2003. 18 с.
15. Яковенко Б.В. Особливості метаболізму гліцину в організмі коропа лускатого : автореф. дис. ... докт. біол. наук. Львів, 1993. 38 с.
16. Яковенко Б.В., Курант В.З., Явоненко А.Ф. Влияние температуры и pH среды на активность некоторых аминотрансфераз в тканях карпа. *Гидробиол. журн.* 1981. Т. 17. № 2. С. 69—72.
17. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review / K. Birnie-Gauvin et al. *Fish and Fisheries*. 2017. Vol. 18, no. 5. P. 928–942. URL: <https://doi.org/10.1111/faf.12215>.
18. A review on heavy metal-induced toxicity in fishes: Bioaccumulation, antioxidant defense system, histopathological manifestations, and transcriptional profiling of genes / M. Kumar et al. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2024. Vol. 83. 127377. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2023.127377>
19. Abdel-Baki A. S., Dkhil M. A., Al-Quraishy S. Bioaccumulation of some heavy metals in tilapia fish relevant to their concentration in water and sediment of Wadi Hanifah, Saudi Arabia. *Af. J. Biotech.* 2011. Vol. 10(13). P. 2541-2547.
20. Activities of Superoxide Dismutase and Catalase in Erythrocytes and Plasma Transaminases of Goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) Exposed to Cadmium / R. Žikić et al. *Physiological Research*. 2001. P. 105–111. URL: <https://doi.org/10.33549/physiolres.930000.50.105>.

21. Acute and Chronic Toxicity of Cobalt to Freshwater Organisms: Using a Species Sensitivity Distribution Approach to Establish International Water Quality Standards / W. A. Stubblefield et al. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2020. Vol. 39, no. 4. P. 799–811. URL: <https://doi.org/10.1002/etc.4662>.
22. Acute Phase Proteins and their Potential Role as an Indicator for Fish Health and in Diagnosis of Fish Diseases / S. Roy et al. *Protein & Peptide Letters*. 2016. Vol. 24, no. 1. P. 78–89. URL: <https://doi.org/10.2174/0929866524666161121142221>.
23. Adams S. M., Greeley M. S. Ecotoxicological indicators of water quality: Using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems. *Water, air and soil pollution*. 2000. Vol. 123. P. 103–115.
24. Adriano D.C. Trace elements in the terrestrial environment. New York, NY: Springer New York. 1986. 533 p. URL: <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1907-9>
25. Afanasyev S.O. Impact of War on Hydroecosystems of Ukraine: Conclusion of the First Year of the Full-Scale Invasion of Russia (a Review). *Hydrobiological Journal*. 2023. Vol. 59. No. 4. P. 3-16. URL: <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v59.i4.10>.
26. Ahmed Q., Benzer S., Elahi N. Seasonal variations of heavy metal concentration in *Sardinella sindensis* (Day, 1878) from Balochistan coast. *J. Cos. Lif. Med*. 2015. Vol. 3(5). P. 337-340. URL: <https://doi.org/10.12980/JCLM.3.2015JCLM-2015-0009>.
27. Ahmed I., Zakiya A., Fazio F. Effects of aquatic heavy metal intoxication on the level of hematocrit and hemoglobin in fishes: A review. *Frontiers in Environmental Science*. 2022. Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.919204>.
28. Alharbi T., El-Sorogy A. Assessment of metal contamination in coastal sediments of Al-Khobar area, Arabian Gulf, Saudi Arabia. *Journal of African Earth Sciences*. 2017. Vol. 129. P. 458–468. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2017.02.007>.

29. Ali H., Khan E. Bioaccumulation of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in freshwater fish. Risk to human health. *Environmental Chemistry Letters*. 2018b. Vol. 16. P. 903–917. URL: <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0734-7>.
30. Ali H., Khan E., Ilahi I. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Journal of Chemistry*. 2019. Vol. 2019. P. 1-14. URL: <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>.
31. Alterations in the Blood Biochemistry of Salmo Trutta Fario Exposed to Cobalt Chlorite / Atamanalp M. et al. National Water Days, Elazig, Turkey. 2009. 43 p. URL: <https://doi.org/10.3923/javaa.2010.2167.2170>.
32. An Overview of Ecological Indicators of Fish to Evaluate the Anthropogenic Pressures in Aquatic Ecosystems: From Traditional to Innovative DNA-Based Approaches / M. Pinna et al. *Water*. 2023. Vol. 15, no. 5. P. 949. URL: <https://doi.org/10.3390/w15050949>.
33. Anand P., Akhter Y. A review on enzyme complexes of electron transport chain from Mycobacterium tuberculosis as promising drug targets. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022. Vol. 212. P. 474–494. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.124>
34. Assessing pollution in the Danube River near Novi Sad (Serbia) using several biomarkers in sterlet (Acipenser ruthenus L.) / B. Stanic et al. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2006. Vol. 65, no. 3. P. 395–402. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.08.005>.
35. Assessing reproductive and endocrine parameters in male largescale suckers (Catostomus macrocheilus) along a contaminant gradient in the lower Columbia River, USA / J. A. Jenkins et al. *Science of The Total Environment*. 2014. Vol. 484. P. 365-378. URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.097>.
36. Assessment of water quality index and some oxidative stress biomarkers in Labeo rohita as the indicator of aquatic pollution in different ponds of Malda,

- West Bengal, India / M. Hore et al. *Fundamental and Applied Limnology*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1127/fal/2022/1443>.
37. Atli G., Canli M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2007. Vol. 145, no. 2. P. 282–287. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.12.012>.
38. Authman M. M. Use of Fish as Bio-indicator of the Effects of Heavy Metals Pollution. *Journal of Aquaculture Research & Development*. 2015. Vol. 06, no. 04. URL: <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000328>.
39. Bending the Curve of Global Freshwater Biodiversity Loss: An Emergency Recovery Plan / D. Tickner et al. *BioScience*. 2020. Vol. 70, no. 4. P. 330–342. URL: <https://doi.org/10.1093/biosci/biaa002>
40. Bentley P. J. A high-affinity zinc-binding plasma protein in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 1991. Vol. 100, no. 3. P. 491–494. URL: [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90028-r](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90028-r).
41. Bergmeyer H.G., Bernet E. Methods of enzymatic analysis. Vienne : Verlag Chemie., 1974. P. 324–328.
42. Bioaccumulation and bioremediation of heavy metals in fishes - A review / F. J. Emon et al. *Toxics*. 2023. Vol. 11, no. 6. 510. URL: <https://doi.org/10.3390/toxics11060510>
43. Bioaccumulation and elimination rate of cobalt in *Capoeta fusca* under controlled conditions / B. Mansouri et al. *Chemical Speciation & Bioavailability*. 2013. Vol. 25, no. 1. P. 52–56. URL: <https://doi.org/10.3184/095422913x13581898658634>.
44. Bioaccumulation of mercury, cadmium, zinc, chromium, and lead in muscle, liver, and spleen tissues of a large commercially valuable catfish species from Brazil / F. P. Arantes et al. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2016. Vol. 88, no. 1. P. 137–147. URL: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620140434>

45. Bioaccumulation of mining derived metals in blood, liver, muscle and otoliths of two Arctic predatory fish species (*Gadus ogac* and *Myoxocephalus scorpius*) / S. V. Hansson et al. *Environmental Research*. 2020. Vol. 183. P. 109194. URL: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109194>.
46. Bioconcentration and bioaccumulation of metal in freshwater Neotropical fish *Geophagus brasiliensis* / C. L. Voigt et al. *Environmental Science and Pollution Research*. 2014. Vol. 22, no. 11. P. 8242–8252. URL: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3967-4>.
47. Biomarker responses and PAH uptake in *Mya truncata* following exposure to oil-contaminated sediment in an Arctic fjord (Svalbard) / L. Camus et al. *Science of The Total Environment*. 2003. Vol. 308, no. 1-3. P. 221–234. URL: [https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(02\)00616-2](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(02)00616-2).
48. Blaxhall P. C., Daisley K. W. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*. 1973. Vol. 5, no. 6. P. 771–781. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1973.tb04510.x>
49. Blust R. Cobalt. *Fish Physiology*. 2011. P. 291–326. URL: [https://doi.org/10.1016/s1546-5098\(11\)31006-0](https://doi.org/10.1016/s1546-5098(11)31006-0).
50. Borbely G., Nagy E. Removal of zinc and nickel ions by complexation–membrane filtration process from industrial wastewater. *Desalination*. 2004. Vol. 240, no. 1-3. P. 218–226. URL: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.11.073>.
51. Borgia V.J.F., Thatheyus A.J., Murugesan A.G. Impact of electroplating industry effluent on the electrophoretic protein pattern of serum in the freshwater fish *Cyprinus carpio*. *Ind. J. Biochem. Bioph.* 2019. Vol. 56. P. 460-465.
52. Botros M, Sikaris KA. The de Ritis ratio: the test of time. *Clin. Biochem. Rev.* 2013. Vol. 34 (3). P. 117—130.
53. Bbraich O.S., Jangu S. Some Aspects of Reproductive Biology On Effect of Heavy Metal Pollution On the Histopathological Structure of Gonads in *Labeo rohita*, 7. (Hamilton- Buchanan) from Harike wetland, India. *International*

- Journal of Fisheries and Aquaculture*. 2015. Vol. 7, no. 2. P. 9–14. URL: <https://doi.org/10.5897/IJFA15.0469>.
54. Bundy R.M. Elevated sources of cobalt in the Arctic Ocean. *Biogeosciences*. 2020. Vol. 17, no. 19. P. 4745–4767. URL: <https://doi.org/10.5194/bg-17-4745-2020>.
55. Calderón-Ospina C.A., Nava-Mesa M.O. B Vitamins in the nervous system: Current knowledge of the biochemical modes of action and synergies of thiamine, pyridoxine, and cobalamin. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2020. Vol. 26, no. 1. P. 5–13. URL: <https://doi.org/10.1111/cns.13207>.
56. Cellular and oxidative stress responses of *Mytilus galloprovincialis* to chlorpromazine: implications of an antipsychotic drug exposure study / F. Impellitteri et al. *Frontiers in Physiology*. 2023. Vol. 14. URL: <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1267953>.
57. Characterization of Ca^{2+} transport in *Euglena gracilis* mitochondria / A. Uribe et al. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1994. Vol. 1186, no. 1-2. P. 107–116. URL: [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(94\)90141-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(94)90141-4).
58. Chowdhury M.J., Wood C.M. Renal function in the freshwater rainbow trout after dietary cadmium acclimation and waterborne cadmium challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2007. Vol. 145, no. 3. P. 321–32. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.01.004>.
59. Christensen N. J. Notes on the Glucose Oxidase Method. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 1967. Vol. 19 (4). P. 379–384. <https://doi.org/10.3109/00365516709090653>.
60. Cobalamin deficiency: Clinical picture and radiological findings / C. Briani et al. *Nutrients*. 2013. Vol. 5, no. 11. P. 4521–4539. URL: <https://doi.org/10.3390/nu5114521>.
61. Cobalt induces oxidative stress in isolated liver mitochondria responsible for permeability transition and intrinsic apoptosis in hepatocyte primary cultures / V. Battaglia et al. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*.

2009. Vol. 41, no. 3. P. 586–594.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.07.012>.

62. Cobalt uptake across the gills of the common carp, *Cyprinus carpio*, as a function of calcium concentration in the water of acclimation and exposure / S. Comhaire et al. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 1994. Vol. 109, no. 1. P. 63–76. URL: [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(94\)00039-d](https://doi.org/10.1016/0742-8413(94)00039-d).
63. Cobalt-induced genotoxicity in male zebrafish (*Danio rerio*), with implications for reproduction and expression of DNA repair genes / H. C. Reinardy et al. *Aquatic Toxicology*. 2013. Vol. 126. P. 224-230. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.007>.
64. Cobalt-induced oxidative stress in brain, liver and kidney of goldfish *Carassius auratus* / O.I. Kubrak et al. *Chemosphere*. 2011. Vol. 85, no. 9. P. 983-989. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.078>.
65. Collins R.N., Kinsela A.S. The aqueous phase speciation and chemistry of cobalt in terrestrial environments. *Chemosphere*. 2010. Vol. 79, no. 8. P. 763-771. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.03.003>.
66. Comparative study of the biochemical and haematological parameters of four wild Tyrrhenin fish species / Fazio F. et al. *Veterinarni Medicina*. 2013. Vol. 58 (11). P. 576-81. URL: <https://doi.org/10.17221/7139-VETMED>.
67. Comparison of lead, cadmium, copper and cobalt adsorption onto metal oxides and organic materials in natural surface coatings / D. Dong et al. *Microchemical Journal*. 2007. Vol. 85, no. 2. P. 270-275. URL: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2006.06.015>.
68. Comprehensive assessment and potential ecological risk of trace element pollution (As, Ni, Co and Cr) in aquatic environmental samples from an industrialized area / M. Díaz-de-Alba et al. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021. Vol. 18, no. 14. 7348. URL: <https://doi.org/10.3390/ijerph18147348>.

69. Concentration of heavy metals in seafood (fishes, shrimp, lobster and crabs) and human health assessment in Saint Martin Island, Bangladesh / M. A. Baki et al. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018. Vol. 159. P. 153–163. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.035>.
70. Coz-Rakovac R., Smuc T., Topic Popovic N. et al. Novel methods for assessing fish blood biochemical data. *J. Appl. Ichthyol.* 2008. Vol. 24. P. 77—80. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2007.01041.x>.
71. C-Reactive Protein a Suitable Marker for Heavy Metal Toxicity: A Comparative Study for Two Freshwater Fish Species Response to Cadmium. Alaa J. Hassan et. al. *Journal of Global Pharma Technology*. 2017. Vol. 10(9). P. 375-382.
72. CREȚU R. Research on Some Freshwater Fish Catalase Activity - As a Potential Biomarker for Environmental Pollution. *The Annals of “Dunarea de Jos” University of Galati. Fascicle IX, Metallurgy and Materials Science*. 2021. Vol. 44, no. 4. P. 22–29. URL: <https://doi.org/10.35219/mms.2021.4.04>.
73. Dando P. R. Lactate Metabolism in Fish. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 1969. Vol. 49(1). P. 209–223.
74. Decreased Brain Levels of Vitamin B12 in Aging, Autism and Schizophrenia / Y. Zhang et al. PLoS ONE. 2016. Vol. 11, no. 1. e0146797. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146797>.
75. DeForest D. K., Brix K. V., Adams W. J. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquatic Toxicology*. 2007. Vol. 84, no. 2. P. 236–246. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.02.022>.
76. Doherty V.F., Ogunkuade O.O., Kanife U.C. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in some selected fishes in Lagos, Nigeria. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*. 2010. Vol. 7 (3). P. 359–365.
77. Drabkin D, Austin H. Spectrophotometric studies preparations from washed blood cells. *J. Biol. Chem.* 1935. Vol. 112. P. 51-55,.

- 78.Dudgeon D. Multiple threats imperil freshwater biodiversity in the Anthropocene. *Current Biology*. 2019. Volume 29, Issue 19, P. R960-R967. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.002>.
- 79.Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen* / Lennena C.S. et al. *Aquaculture*. 2004. Vol. 239. P. 497-507. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.021>.
- 80.Effect of Stressors on Haematological and Hormonal Parameters of *Garra gotyla* / J. Sharma et al. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2017. Vol. 6, no. 5. P. 357–369. URL: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.041>.
- 81.Effects of Co sources and levels on growth performance, serum biochemistry, metabolic activities and Co contents in the tissue for juvenile / X. Li et al. *North American Journal of Aquaculture*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1002/naaq.10243>.
- 82.Effects of heavy metals on fish physiology – A review / M. Shahjahan et al. *Chemosphere*. 2022. Vol. 300. P. 134519. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134519>.
- 83.Evans D. H., Claiborne J. B., Physiology of Fishes. CRC Press. Tylor and Francis Group. 2016. <https://doi.org/10.1080/17451000.2016.1169299>.
- 84.Factors Determining the Degree of Heavy Metals' Toxicity to Fish (a Review) / N. Y. Yevtushenko et al. *Hydrobiological Journal*. 2021. Vol. 57, no. 4. P. 75–85. URL: <https://doi.org/10.1615/hydrobj.v57.i4.70>.
- 85.Fadhlaoui M., Couture P. Combined effects of temperature and metal exposure on the fatty acid composition of cell membranes, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology*. 2016. Vol. 180. P. 45–55. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.09.005>.
- 86.Farombi E., Adelowo O., Ajimoko Y. Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *International Journal of*

- Environmental Research and Public Health*. 2007. Vol. 4, no. 2. P. 158–165.
URL: <https://doi.org/10.3390/ijerph2007040011>.
87. Fernandes M.N. Environmental pollution and fish gill morphology / Fish Adaptation / Eds A.L. Val B.C. Kapoor. Enfield: Sci. Publ. 2003. P. 203–231.
 88. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology*. 2003. Vol. 15, no. 2. P. 247–254. URL: [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(03\)00002-4](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(03)00002-4).
 89. First insight in trace element distribution in the intestinal cytosol of two freshwater fish species challenged with moderate environmental contamination / T. Mijošek et al. *Science of The Total Environment*. 2021. Vol. 798. 149274. URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149274>
 90. Fish as bioindicators in aquatic environmental pollution assessment: A case study in Lake Victoria wetlands, Uganda / I. Naigaga et al. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*. 2011. Vol. 36, no. 14-15. P. 918–928. URL: <https://doi.org/10.1016/j.pce.2011.07.066>.
 91. Fish morphometric body condition indices reflect energy reserves but other physiological processes matter / P. Brosset et al. *Ecological Indicators*. 2023. Vol. 154. P. 110860. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.110860>.
 92. Fisher N. S., Hook S. E. Toxicology tests with aquatic animals need to consider the trophic transfer of metals. *Toxicology*. 2002. Vol. 181-182. P. 531–536. URL: [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00475-4](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00475-4).
 93. Flora S.J.S., Sharma A. Metals. In: Gupta G., editor. *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press: San Diego, CA, USA. 2019. P. 529–549.
 94. Fraústo da Silva J J R, Williams R. J. P. *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life* (Oxford, 2001; online edn, Oxford Academic, 31 Oct. 2023). P. 436–449.
 95. Gashkina N. A. Metal Toxicity: Effects on Energy Metabolism in Fish. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. Vol. 25, no. 9. P. 5015. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms25095015>.

96. Geometallurgy of cobalt ores: A review / Q. Dehaine et al. *Minerals Engineering*. 2021. Vol. 160. 106656. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2020.106656>.
97. Geotracers: Changing the way we explore ocean chemistry / R. Anderson et al. *Oceanography*. 2014. Vol. 27, no. 1. P. 50–61. URL: <https://doi.org/10.5670/oceanog.2014.07>.
98. Ghabbour E.A., Scheinost A.C., Davies G. XAFS studies of cobalt (II) binding by solid peat and soil-derived humic acids and plant-derived humic acid-like substances. *Chemosphere*. 2007. Vol. 67, no. 2. P. 285–291 URL: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.09.094>.
99. Goldberg A.L., Chang T.W. Regulation and significance of amino acid metabolism in skeletal muscle. *Fed. Proc.* 1988. Vol. 37, N 9. P. 2301—2307.
100. Gopal V., Parvathy S., Balasubramanian P.R. Effect of heavy metals on the blood protein biochemistry of the fish *Cyprinus carpio* and its use as a bioindicator of pollution stress. *Environ. Monit. Assess.* 1997. Vol. 48. P. 117–124.
101. Growth and health status of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, exposed to chronic water born cobalt / C. Chen et al. *Fish & Shellfish Immunology*. 2020. Vol. 100. P. 137–145. URL: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.011>.
102. Haematological, blood biochemical and histopathological effects of sublethal cadmium and lead concentrations in common carp / K. Khalesi et al. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2017. Vol. 20, no. 2. P. 141–150. URL: <https://doi.org/10.15547/bjvm.965>.
103. Hamilton E.I. The geobiochemistry of cobalt. *Science of The Total Environment*. 1994. Vol. 150, no. 1–3. P. 7–39. URL: [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(94\)90126-0](https://doi.org/10.1016/0048-9697(94)90126-0)
104. Hamza T. A., Hadwan M. H. New Spectrophotometric Method for the Assessment of Catalase Enzyme Activity in Biological Tissues. *Current*

- Analytical Chemistry*. 2020. Vol. 16, no. 8. P. 1054–1062.
URL: <https://doi.org/10.2174/1573411016666200116091238>.
105. Health risk assessment and metal contamination in fish, water and soil sediments in the East Kolkata Wetlands, India, Ramsar site / N. Kumar et al. *Scientific Reports*. 2023. Vol. 13. 1546. URL: <https://doi.org/10.1038%2Fs41598-023-28801-y>.
106. Heavy metal pollution and risk assessment by the battery of toxicity tests / M. S. Khan et al. *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73468-4>.
107. Heavy metal pollution in the aquatic environment: efficient and low-cost removal approaches to eliminate their toxicity: a review / K. H. Hama Aziz et al. *RSC Advances*. 2023. Vol. 13, no. 26. P. 17595–17610. URL: <https://doi.org/10.1039/d3ra00723e>.
108. Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from a polluted neotropical river / A. L. Paschoalini et al. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019. Vol. 169. P. 539–550. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.047>.
109. Heavy metals bioaccumulation in selected tissues of red swamp crayfish: an easy tool for monitoring environmental contamination levels / E. Goretti et al. *Science of The Total Environment*. 2016. Vol. 559. P. 339–346. URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.169>.
110. Hemmadi V. A critical review on integrating multiple fish biomarkers as indicator of heavy metals contamination in aquatic ecosystem. *International Journal of Bioassays*. 2017. Vol. 6, no. 9. P. 5494. URL: <https://doi.org/10.21746/ijbio.2017.9.5>.
111. Heydarnejad M.S., Khosravian-Hemamai M., Nematollahi A. Effects of cadmium at sub-lethal concentration on growth and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ir. Vet. J.* 2003. Vol. 66, N 11. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-66-11>.

112. Hilt G., Hapke M. Cobalt Catalysis in Organic Synthesis: Methods and Reactions. Wiley & Sons, Incorporated, John, 2019. 480 p.
113. Howe P.L., Reichelt-Brushett A.J., Clark M.W. Effects of Cd, Co, Cu, Ni and Zn on asexual reproduction and early development of the tropical sea anemone *Aiptasia pulchella*. *Ecotoxicology*. 2014. Vol. 23. P. 1593–1606. URL: <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1299-2>.
114. In vivo induction of antioxidant response and oxidative stress associated with genotoxicity and histopathological alteration in two commercial fish species due to heavy metals exposure in northern India (Kali) river / M. Fatima et al. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2015. Vol. 176-177. P. 17–30. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.07.004>.
115. Influence of heavy metals on physiological and biochemical parameters of *Pseudorasbora parva* (Cypriniformes, Cyprinidae) / O. M. Marenkov et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2021. Vol. 12, no. 4. P. 745–752. URL: <https://doi.org/10.15421/0221103>.
116. ISO (1986) Water quality – Determination of cobalt, nickel, copper, zinc, cadmium and lead – Flame atomic absorption spectrometric methods. Geneva, International Organization for Standardization (ISO 8288–1986 (E)). – Режим доступа: www.iso.org/iso/iso_catalogue.
117. Jadaa W., Mohammed H.K. Heavy metals – definition, natural and anthropogenic sources of releasing into ecosystems, toxicity, and removal methods – an overview. *Study. J. Ecol. Eng.* 2023. Vol. 24(6). P. 249-271. URL: <https://doi.org/10.12911/22998993/162955>.
118. James R, Sampath K, Ponmani KP. Effect of metal mixtures on activity of two respiratory enzymes and their recovery in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Indian J Exp Biol*. 1992. Vol. 30 (6). P. 496-499.
119. James R., Sampath K., Edward D. S. Copper Toxicity on Growth and Reproductive Potential in an Ornamental Fish, *Xiphophorus helleri*. *Asian*

Fisheries Science. 2003. Vol. 16, no. 4.
URL: <https://doi.org/10.33997/j.afs.2003.16.4.005>.

120. Javed M., Usmani N. An overview of the adverse effects of heavy metal contamination on fish health. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol.Sci.* 2019. Vol. 89. P. 389-403. URL: <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0875-7>
121. Jenkins J.A., Musgrove M., White S.J.O. Outlining Potential Biomarkers of Exposure and Effect to Critical Minerals: Nutritionally Essential Trace Elements and the Rare Earth Elements. *Toxics*. 2023. Vol. 11, no. 2. 188. URL: <https://doi.org/10.3390/toxics11020188>.
122. Jezierska B., Witeska M. The metal uptake and accumulation in fish living in polluted waters. *NATO Science Series*. 2006. Vol. 69. P. 107-114. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4728-2_6.
123. Keckeis H., Schiemer F. The ecology of the early life history stages of riverine fish: New perspectives in conservation and river management. *River Systems*. 2001. Vol. 12, no. 2-4. P. 517–522. URL: <https://doi.org/10.1127/lr/12/2001/517>.
124. Khalesi M. K., Abedi Z., Behrouzi S., Eskandari S. K. Haematological, blood biochemical and histopathological effects of sublethal cadmium and lead concentrations in common carp. *Bulg. J. Vet. Med.* 2017. Vol. 20(2). P. 141–150.
125. Khan M.S., Javed, M., Rehman, M.T. Heavy metal pollution and risk assessment by the battery of toxicity tests. *Sci. Rep.* 2020 Vol. 10. 16593.
126. Kitanishi K., Shimonaka M., Unno M. Characterization of a Cobalt-Substituted Globin-Coupled Oxygen Sensor Histidine Kinase from *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5: Insights into Catalytic Regulation by Its Heme Coordination Structure. *ACS Omega*. 2021. Vol. 6, no. 50. P. 34912–34919. URL: <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05564>.
127. Kocabaş M., Kutluyer F. Effect of cobalt on sperm motility in an endangered trout species, *Salmo coruhensis*. *Bulletin of Environmental Contamination and*

- Toxicology*. 2017. Vol. 99, no. 6. P. 690–694. URL: <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2193-4>.
128. Konovalov Yu. D. Response of the fish protein-synthesizing system on the impact of mercury, cadmium, copper and zinc cations. *Hydrobiol. J.* 2002. Vol. 38 (1). 12 p. doi: 10.1615/HydrobJ.v38.i1.110.
129. Koolman J., Röhm K.-H. Color atlas of biochemistry. Thieme, 1996. 435 p.
130. Kosiorek M. Effect of cobalt on the environment and living organisms - a review. *Applied Ecology and Environmental Research*. 2019. P. 11419–11449. URL: https://doi.org/10.15666/aeer%2F1705_1141911449.
131. Kulkarni R.S. Blood serum concentration of protein, albumin and globulin in locally available four fresh water fishes. *International Journal of Current Advanced Research*. 2021. Vol 10. P. 23613-23615. doi.org/10.24327/ijcar.2021.23615.4681.
132. Kuz'mina V.V., Ushakova N.V. Effects of temperature, pH, and heavy metals (copper, zinc) upon proteinase activities in digestive tract mucosa of typical and facultative piscivorous fish. *J. Ichthyol.* 2007. Vol. 47. P. 473–480. doi.org/10.1134/S0032945207060070.
133. Lall S.P., Kaushik S.J. Nutrition and metabolism of minerals in fish. *Animals*. 2021. Vol. 11, no. 9. 2711. URL: <https://doi.org/10.3390/ani11092711>.
134. Lam P. K. S. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean & Coastal Management*. 2009. Vol. 52, no. 7. P. 348–354. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2009.04.010>
135. Lau O.W., Cheng O.M. Determination of zinc in environmental samples by anodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*. 1998. Vol. 376. P. 197–207. URL: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00531-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00531-5).
136. Lauwerys R., Lison D. Health risks associated with cobalt exposure — an overview. *Science of The Total Environment*. 1994. Vol. 150, no. 1–3. P. 1-6. URL: [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(94\)90125-2](https://doi.org/10.1016/0048-9697(94)90125-2).
137. Layglon N., Creffield S., Bakker E., Tercier-Waeber M-L. On-field high-resolution quantification of the cobalt fraction available for bio-uptake in natural

- waters using antifouling gel-integrated microelectrode arrays. *Marine Pollution Bulletin*. 2023. Vol. 189. 114807. URL: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114807>.
138. Lin Y.H., Wu J.Y., Shiau S.Y. Dietary cobalt can promote gastrointestinal bacterial production of vitamin B12 in sufficient amounts to supply growth requirements of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*. 2010. Vol. 302, no. 1-2. P. 89–93. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.008>.
 139. Linnik P. N. Heavy Metals in Surface Waters of Ukraine: Their Content and Forms of Migration. *Hydrobiological Journal*. 2000. Vol. 36, no. 3. P. 24. URL: <https://doi.org/10.1615/hydrobj.v36.i3.20>.
 140. Lopez-Barrera E.A., Barragan-Gonzalez R.G. Metals and metalloid in eight fish species consumed by citizens of Bogota D.C., Colombia, and potential risk to humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2016. Part A. Vol. 79, no. 5. P. 232–243. URL: <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1149130>.
 141. Loss of the Vitamin B-12 Transport Protein Tcn2 Results in Maternally Inherited Growth and Developmental Defects in Zebrafish / C. R. Benoit et al. *The Journal of Nutrition*. 2021. Vol. 151, no. 9. P. 2522–2532. URL: <https://doi.org/10.1093/jn/nxab151>.
 142. Lushchak V. I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2015. Vol. 42, no. 2. P. 711–747. URL: <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0171-5>.
 143. Lushchak V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. 2011. Vol. 101, no. 1. P. 13–30. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>.
 144. Ma Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2013. Vol. 53, no. 1. P. 401–426. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>.
 145. Mahboob S. Environmental pollution of heavy metals as a cause of oxidative stress in fish : a review. *Life Sci. J*. 2013. Vol. 10. P. 336–347.

146. Maheshwari N., Mahmood R. Protective effect of catechin on pentachlorophenol-induced cytotoxicity and genotoxicity in isolated human blood cells. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020. Vol. 27, no. 12. P. 13826–13843. URL: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07969-0>.
147. Malmqvist B., Rundle S. Threats to the running water ecosystems of the world. *Environmental conservation*. 2002. Vol. 29, no. 2. P. 134–153.
148. Manoj K., Padhy P.K. Oxidative Stress and Heavy Metals: An Appraisal with Reference to Environmental Biology. *International Research Journal of Biological Sciences*. 2013. Vol. 2(10). P. 91-101.
149. Mashoof S., Criscitiello M. Fish Immunoglobulins. *Biology*. 2016. Vol. 5, no. 4. P. 45. URL: <https://doi.org/10.3390/biology5040045>.
150. Mensoor M., Said A. Determination of heavy metals in freshwater fishes of the Tigris River in Baghdad. *Fishes*. 2018. Vol. 3, no. 2. 23. URL: <https://doi.org/10.3390/fishes3020023>.
151. Metal Contaminants in Fish: Blood as a Potential Non-lethal Monitoring Tool / L. Gouthier et al. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2023. Vol. 111, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1007/s00128-023-03762-0>.
152. Metal determination and biochemical status of marine fishes facilitate the biomonitoring of marine pollution / N. Kumar et al. *Marine Pollution Bulletin*. 2021. Vol. 170. P. 112682. URL: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112682>.
153. Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review / M. Sevcikova et al. *Veterinární Medicína*. 2011. Vol. 56, No. 11. P. 537–546. URL: <https://doi.org/10.17221/4272-vetmed>.
154. Metals, Microbes, and Minerals - The Biogeochemical Side of Life / ed. by P. Kroneck, M. Sosa Torres. De Gruyter, 2021. URL: <https://doi.org/10.1515/9783110589771>.

155. Misra H. P., Fridovich I. The Generation of Superoxide Radical during the Autoxidation of Hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*. 1972. Vol. 247, no. 21. P. 6960–6962. URL: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)44679-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)44679-6).
156. Moiseenko T.I. Impact of geochemical factors of aquatic environment on the metal bioaccumulation in fish. *Geochem Int*. 2015. Vol. 53(3). P. 213-223. URL: <https://doi.org/10.1134/S001670291503009X>.
157. Molecular analysis of chromium and cobalt-related toxicity / B. Scharf et al. *Scientific Reports*. 2014. Vol. 4, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/srep05729>.
158. Moore J. W., Ramamoorthy S. Heavy metals in natural waters. Berlin Heidelberg New York: Springer. 1984. 270 p.
159. Nabi N., Ahmed I., Wani G. B. Hematological and serum biochemical reference intervals of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* cultured in Himalayan aquaculture: Morphology, morphometrics and quantification of peripheral blood cells. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2022. Vol. 29, no. 4. P. 2942–2957. URL: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.01.019>.
160. Naidu K. A., Naidu K. A., Ramamurthi R. Acute effect of mercury toxicity on some enzymes in liver of teleost *Sarotherodon mossambicus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1984. Vol. 8, no. 3. P. 215–218. URL: [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(84\)90024-1](https://doi.org/10.1016/0147-6513(84)90024-1).
161. Namieśnik J., Rabajczyk A. The speciation and physico-chemical forms of metals in surface waters and sediments. *Chemical Speciation & Bioavailability*. 2010. Vol. 22, no. 1. P. 1–24. URL: <https://doi.org/10.3184/095422910X12632119406391>.
162. Nasri F., Heydarnejad S., Nematollahi A. Sublethal cobalt toxicity effects on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Croatian J. Fisheries*. 2019. Vol. 77(4). P. 243–252.
163. Nazir R., Khan, Masab M. et al. Accumulation of heavy metals (Ni, Cu, Cd, Cr, Pb, Zn, Fe) in the soil, water and water collected from Tanda Dam Kohat / et al. *J. Pharm. Sci. Res*. 2015. Vol. 7(3). P. 89–97.

164. Nechev J., Stefanov K., Popov S. Effect of cobalt ions on lipid and sterol metabolism in the marine invertebrates *Mytilus galloprovincialis* and *Actinia equina*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2006. Vol. 144, no. 1. P. 112–118. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.022>.
165. Non-enzymatic antioxidant responses of *Mytilus galloprovincialis*: Insights into the physiological role against metal-induced oxidative stress / G. Santovito et al. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2021. Vol. 240. P. 108909. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108909>.
166. Nordberg G.F., Fowler B.A. Nordberg M. Handbook on the Toxicology of Metals; Academic Press: New York, NY, USA, 2015. p. 1385.
167. NTP (National Toxicology Program). 2021. Report on Carcinogens, Fifteenth Edition. Research Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. URL: <https://doi.org/10.22427/NTP-OTHER-1003>.
168. Nurfaidah N., Metusalach M., Sukarno S., Mahendradatta M. Protein and albumin contents in several freshwater fish species of Makassar, South Sulawesi. *Int. Food Res. J.* 2021. Vol. 28(4). P. 745–751. URL: <https://doi.org/10.47836/ifrj.28.4.11>.
169. Odaka M., Kobayashi M. Cobalt Proteins, Overview. Encyclopedia of Metalloproteins. New York, NY. 2013. P. 670–678. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1533-6_69.
170. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 1979. Vol. 95, no. 2. P. 351–358. URL: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
171. Okwuosa O.B., Eyo J.E., Omovwohwovie E.E. Role of Fish as Bioindicators: A Review. *Iconic Res. Engineering J.* 2019, Vol. 2. P. 354-368.
172. Oluah N.S. Plasma aspartate amino transferase activity in the catfish *Clarias albopunctatus* exposure to sublethal zinc and mercury. *Bul. Environ. Contam.*

- Toxicol.* 1999. Vol. 63. P. 343—349. URL: <https://doi.org/10.1007/s001289900986>
173. Öner M., Atli G., Canli M. changes in serum biochemical parameters of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008. Vol. 27, no. 2. P. 360. URL: <https://doi.org/10.1897/07-281r.1>
 174. Padmavathy P., Ramanathan N., Francis T. Glucose, Lactate and Pyruvate Metabolism in *Labeo rohita* with Reference to Ambient Oxygen. *Asian Fisheries Science*. 2003. Vol. 16, no. 1. URL: <https://doi.org/10.33997/j.afs.2003.16.1.006>.
 175. Panigrahi A. K. A Comprehensive Review on the Uptake by and Accumulation of Some Heavy Metals in Fresh Water Fishes. *Bioscience Biotechnology Research Communications*. 2021. Vol. 14, no. 1. P. 387–396. URL: <https://doi.org/10.21786/bbrc/14.1/55>.
 176. Papachristodoulou D., Snape A., Elliott W.H., Elliott D.C. Biochemistry and molecular biology. Oxford : Oxford Univ. Press, 2018. 607 p.
 177. Parveen S., Bharose R., Singh D. Effect of tannery waste water on lactate dehydrogenase (LDH) enzyme activity of fresh water fish. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2017. Vol. 5(2). P. 643-647.
 178. Paschoalini A.L., Bazzoli N. Heavy metals affecting Neotropical freshwater fish: A review of the last 10 years of research. *Aquatic Toxicology*. 2021. Vol. 237. 105906. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105906>.
 179. Patterns of metal composition and biological condition and their association in male common carp across an environmental contaminant gradient in Lake Mead National Recreation Area, Nevada and Arizona, USA / R. Patiño et al. *Science of The Total Environment*. 2012. Vol. 416. P. 215–224. URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.11.082>.
 180. Petrucci R.H. Harwood W.S., Herring G.F., Madura J.D. General Chemistry: Principles & Modern Applications, 9th Edition. New Jersey: Pearson Education, Inc., 2007. 1172 p.

181. Plasma proteins of young African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822). / J. H. Boon et al. *Netherlands Journal of Agricultural Science*. 1987. Vol. 35, no. 4. P. 521–524. URL: <https://doi.org/10.18174/njas.v35i4.16710/>
182. Protein measurement with the Folin phenol reagent / Lowry J.O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. [et al.]. *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.
183. Qu K., Dan D. Chapter 2 - Pretreatment techniques for environmental samples. *Environmental Analytical Chemistry*. 2024. P. 35-63. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-21966-5.00002-8>
184. Qu K., Dan D. Chapter 5 - Analysis of water pollutants. *Environmental Analytical Chemistry*. 2024. P. 131-165. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-21966-5.00005-3>
185. Rajeshkumar S., Li X. Bioaccumulation of heavy metals in fish species from the Meiliang Bay, Taihu Lake, China. *Toxicology Reports*. 2018. Vol. 5. P. 288–295. URL: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.01.007>
186. Rani B., Singh R. A Review on Metals Induced Oxidative Stress in Fish. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2019. Vol. 8, no. 07. P. 264–278. URL: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.807.034> .
187. Reddy S.J. Impact of heavy metals on changes in metabolic biomarkers of carp fish, *Cirrhinus mrigala*. *International Journal of Bioassays*. 2012. Vol. 1(12). P. 227-232.
188. Reitman S., Franckel S. Colorimetric determination of glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Path.* 1957. Vol. 28. P. 53—56.
189. Relationship between soil cobalt and vitamin B12 levels in the liver of livestock in Saudi Arabia: role of competing elements in soils / E. A. Huwait et al. *African Health Sciences*. 2015. Vol. 15, no. 3. P. 993–998. URL: <https://doi.org/10.4314%2Fahs.v15i3.38>.

190. Rema L.P, Babu. P. Effect of mercury and zinc on some metabolically important enzymes of *Oreochromis mossambicus*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*. 2012. Vol. 41(4). P. 317-380.
191. Renal function in the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following acute and prolonged exposure to waterborne nickel / E. F. Pane et al. *Aquatic Toxicology*. 2005. Vol. 72, no. 1-2. P. 119-33. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.11.020>.
192. Renitasari D. P., Kurniawan A., Kurniaji A. Blood glucose of tilapia fish *Oreochromis mossambica* as a water bioindicator in the downstream of Brantas Waters, East Java. *AACL Bioflux*. 2021. 14 (4). P. 2040-2049.
193. Reproducible¹H NMR-Based Metabolomic Responses in Fish Exposed to Different Sewage Effluents in Two Separate Studies / L. M. Samuelsson et al. *Environmental Science & Technology*. 2011. Vol. 45, no. 4. P. 1703–1710. URL: <https://doi.org/10.1021/es104111x>.
194. Rizzo M. Measurement of Malondialdehyde as a Biomarker of Lipid Oxidation in Fish. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2024. Vol. 15, no. 09. P. 303–332. URL: <https://doi.org/10.4236/ajac.2024.159020>.
195. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism / A. Loboda et al. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016. Vol. 73, no. 17. P. 3221–3247. URL: <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2223-0>.
196. Sabullah M. K., Ahmad S. A., Shukor M. Y. Heavy metal biomarker: fish behavior, cellular alteration, enzymatic reaction and proteomics approaches. *Int. Food Res. J*. 2015, Vol. 22. P. 435–454.
197. Saili K.S., Cardwell A.S., Stubblefield W.A. Chronic Toxicity of Cobalt to Marine Organisms: Application of a Species Sensitivity Distribution Approach to Develop International Water Quality Standards. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2021. Vol. 40, no. 5. P.1405–1418. URL: <https://doi.org/10.1002/etc.4993>.

198. Samipillai S. S., Uma U. Effect of Copper Sulphate on Succinate Dehydrogenase and Lactate Dehydrogenase in the Selected Tissues of Fresh Water Fish, Catla Catla. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*. 2018. P. 278–285.
199. Savassi L.A., Arantes F.P., Gomes M.V.T., Bazzoli N. Heavy Metals and Histopathological Alterations in *Salminus franciscanus* (Lima & Britski, 2007) (Pisces: characiformes) in the Paraopeba River, Minas Gerais, Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2016. Vol. 96. P. 478–483. URL: <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1732-8>.
200. Selenium Nanoparticles Attenuate Cobalt Nanoparticle-Induced Skeletal Muscle Injury: A Study Based on Myoblasts and Zebrafish / Z. Tan et al. *Toxics*. 2024. Vol. 12, no. 2. 130. URL: <https://doi.org/10.3390/toxics12020130>.
201. Serin H.M., Arslan E.A. Neurological symptoms of vitamin B12 deficiency: Analysis of pediatric patients. *Acta Clinica Croatica*. 2019. Vol. 58, no. 2. P. 295–302. URL: <https://doi.org/10.20471/acc.2019.58.02.13>.
202. Sfakianakis D.G., Renieri E., Kentouri M., Tsatsakis A.M. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. *Environmental Research*. 2015. Vol. 137. P. 246–255. URL: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.014>.
203. Short term effects of zinc on some sera biochemical parameters and tissue accumulation of *Clarias gariepinus* / Tuncsoy M. et al. *Fresenius Environ. Bul.* 2016. Vol. 2. P. 658—664.
204. Simonsen L. O., Harbak H., Bennekou P. Cobalt metabolism and toxicology—A brief update. *Science of The Total Environment*. 2012. Vol. 432. P. 210–215. URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.009>.
205. Smith C.D., Nowell L.H. Health-Based Screening Levels for evaluating water-quality data (3rd ed.). U.S. Geological Survey web page, accessible at 2024. URL: <https://water.usgs.gov/water-resources/hbsl/>.
206. Smith I.C., Carson B.L. Cobalt. Trace metals in the environment. *Ann Arbor Science Publ.* 1981. Vol. 6. 1202 p.

207. Smith K.S. Metal Sorption on Mineral Surfaces: An Overview with Examples Relating to Mineral Deposits. In G.S. Plumlee and M.J. Logsdon (Eds.): *The Environmental Geochemistry of Mineral Deposits, Reviews in Economic Geology*. 1999. Vol. 6A. P. 161-182.
208. Smith J. T. Modelling the dispersion of radionuclides following short duration releases to rivers. *Science of The Total Environment*. 2006. Vol. 368, no. 2-3. P. 502–518. URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.03.011> (date of access: 04.05.2025).
209. Soundararajan M., Veeraiyan G., Samipillai S.S. Effect of heavy metal Arsenic on haematological parameters of freshwater fish, *Tilapia mossambica*. *Int. J. Modn. Res. Revs*. 2014. Vol. 2(3). P. 132-135.
210. Sperm quality biomarkers complement reproductive and endocrine parameters in investigating environmental contaminants in common carp (*Cyprinus carpio*) from the Lake Mead National Recreation Area / J. A. Jenkins et al. *Environmental Research*. 2018. Vol. 163. P. 149–164. URL: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.01.041>
211. Stohs S.J. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995. Vol. 18, no. 2. P. 321–336. URL: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-h](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-h).
212. Straus W. COLORIMETRIC MICRODETERMINATION OF CYTOCHROME c OXIDASE. *Journal of Biological Chemistry*. 1954. Vol. 207, no. 2. P. 733–743. URL: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)65692-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)65692-3).
213. Sublethal cadmium exposure in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* meets a deficient, poorly responsive metallothionein system while evoking oxidative and cellular stress / L. Gnatyshyna et al. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2022. P. 109490. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109490>.
214. Sule K., Umbaar J., Prenner E.J. Mechanisms of Co, Ni, and Mn toxicity: From exposure and homeostasis to their interactions with and impact on lipids

- and biomembranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2020. Vol. 1862, no. 8. 183250. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183250>.
215. The Alterations in the Hematological Parameters of Brown Trout *Salmo trutta* fario, Exposed to Cobalt Chloride / M. Atamanalp et al. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2010. Vol. 9, no. 16. P. 2167–2170. URL: <https://doi.org/10.3923/javaa.2010.2167.2170>.
216. The distribution of zinc and copper in plasma, erythrocytes and erythrocyte membranes of rainbow trout (*Salmo Gairdneri*) / W. J. Bettger et al. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 1987. Vol. 87, no. 2. P. 445–451. URL: [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(87\)90036-3](https://doi.org/10.1016/0742-8413(87)90036-3).
217. The Effect of Paraquat on Hepatic EROD Activity, Liver, and Gonadal Histology in Males and Females of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Exposed at Different Temperatures / A. Figueiredo-Fernandes et al. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2006. Vol. 51, no. 4. P. 626–632. URL: <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0208-3>.
218. The Effects of Cobalt on the Development, Oxidative Stress, and Apoptosis in Zebrafish Embryos / G. Cai et al. *Biological Trace Element Research*. 2012. Vol. 150, no. 1-3. P. 200–207. URL: <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9506-6>.
219. The role of external inputs and internal cycling in shaping the global ocean cobalt distribution: insights from the first cobalt biogeochemical model / A. Tagliabue et al. *Global Biogeochemical Cycles*. 2018. Vol. 32, no. 4. P. 594–616. URL: <https://doi.org/10.1002/2017GB005830>.
220. Thompson A.M., Denny W.A. Chapter Four - Inhibitors of enzymes in the electron transport chain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 52. P. 97-130, URL: <https://doi.org/10.1016/bs.armc.2019.05.001>.

221. Tovar-Sánchez A., Sañudo-Wilhelmy S.A., Flegal A.R. Temporal and spatial variations in the biogeochemical cycling of cobalt in two urban estuaries: Hudson River Estuary and San Francisco Bay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 2004. Vol. 60, no. 4. P. 717–728. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2004.03.010>.
222. Toxicity of cobalt and copper to rainbow trout: application of a mechanistic model for predicting survival / J. C. A. Marr et al. *Aquatic Toxicology*. 1998. Vol. 43, no. 4. P. 225–238. URL: [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(98\)00061-7](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(98)00061-7).
223. Toxicity of nickel and cobalt in Japanese flounder / Z. Sun et al. *Environmental Pollution*. 2020. Vol. 263. P. 114516. URL: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114516>.
224. Toxicological effect of copper sulphate and cobalt chloride as feed additives on fertility in male albino rats / S.A. Mohammed et al. *Veterinary Medical Journal*. 2014. Vol. 27, no. 1. P. 135–145.
225. Trace elements in the muscle and liver tissues of Garra shamal from the freshwater ecosystem of Oman: an exposure risk assessment / S. M. Al Jufaili et al. *Environmental Science and Pollution Research*. 2024. Vol. 31. P. 15199–15208. URL: <https://doi.org/10.1007/s11356-024-32229-w>.
226. Ture M., Kilic M. B., Altinok I. Relationship Between Heavy Metal Accumulation in Fish Muscle and Heavy Metal Resistance Genes in Bacteria Isolated from Fish. *Biological Trace Element Research*. 2020. Vol. 199. P. 1595–1603. URL: <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02246-0>.
227. US EPA (1994) Methods for determination of metals in environmental samples. Supplement I. Washington, DC, US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development (EPA-600/R-94-111). Режим доступа : www3.epa.gov/caddis/pdf/Methods_for_the_Determination_of_Metals_in_Environmental_Samples.pdf
228. US EPA. Methods for the Determination of Metals in Environmental Samples, Supplement 1. Washington, DC, US Environmental Protection Agency, Office

- of Research and Development (EPA-600/R-94-111). 1994. 260 p. URL: <https://is.gd/PeOcmO>.
229. Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2003. Vol. 13, no. 2. P. 57–149. URL: [https://doi.org/10.1016/s1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/s1382-6689(02)00126-6).
230. Vanderlinde R. E. Measurement of total lactate dehydrogenase activity. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1985. Vol. 15(1). P. 13-31.
231. Velma V., Tchounwou P.B. Chromium-induced biochemical, genotoxic and histopathologic effects in liver and kidney of goldfish, *Carassius auratus*. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2010. Vol. 698. P. 43–51. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.03.014>
232. Vinodhini R., Narayanan M. The impact of toxic heavy metals on the hematological parameters in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.* 2009. Vol. 6(1). P. 23–28.
233. Vitamin B₁₂ Ameliorates Pesticide-Induced Sociability Impairment in Zebrafish (*Danio rerio*): A Prospective Controlled Intervention Study / M. A. Robea et al. *Animals*. 2024. Vol. 14, no. 3. 405. URL: <https://doi.org/10.3390%2Fani14030405>
234. Vitamin B12 deficiency / R. Green et al. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017. Vol. 3. 17040. URL: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.40>.
235. Weis J. Delayed Behavioral Effects of Early Life Toxicant Exposures in Aquatic Biota. *Toxics*. 2014. Vol. 2, no. 2. P. 165–187. URL: <https://doi.org/10.3390/toxics2020165>.
236. Wendelaar Bonga S. E. The stress response in fish. *Physiological Reviews*. 1997. Vol. 77, no. 3. P. 591–625. URL: <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>.
237. Wikström M., Krab K., Sharma V. Oxygen Activation and Energy Conservation by Cytochrome c Oxidase. *Chemical Reviews*. 2018. Vol. 118, no. 5. P. 2469–2490. URL: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00664>.

238. Witeska Małgorzata Stress in fish haematological and immunological effects of heavy metals. *Electronic J. Ichthyol.* 2005. Vol. 1(35) P. 35-41.
239. Wood C.M., Farrell A.P., Brauner C.J. Homeostasis and toxicology of essential metals edited. *Fish Physiology*. London : Academic Press. 2011. Vol. 31. Part A. 497 p.
240. Zaki M. S., Fawzi O.M., Mostafa S.O. et al. Biochemical studies on *Tilapia nilotica* exposed to climate change and cadmium sulphate (0.50 p.p.m). *New York Science Journal*. 2010. Vol. 3(4). P. 90– 95.
241. Zeitoun M. M., El-Sayed E. Impact of water pollution with heavy metals on fish health: Overview and Updates. *Global Veterinaria*. 2014. Vol. 12, no. 2. P. 219-231.
242. Zhang P., Yang M., Lan J. et al. Water quality degradation due to heavy metal contamination: health impacts and eco-friendly approaches for heavy metal remediation / et al. *Toxics*. 2023. Vol. 11, 828. doi.org/10.3390/toxics11100828.
243. Ziwa G., Crane R., Hudson-Edwards K.A. Geochemistry, mineralogy and microbiology of cobalt in mining-affected environments. *Minerals*. 2020. Vol. 11, no. 1. 22. URL: <https://doi.org/10.3390/min11010022>.