

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

РОМАНОВА ЕЛЛА ЕДУАРДІВНА

ДИСЕРТАЦІЯ

УДК 639.3:591.1:577.1

**АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ ТА ОСОБЛИВОСТІ ОБМІНУ ВУГЛЕВОДІВ
І ЛІПІДІВ В ТКАНИНАХ РИБ ЗА ДІЇ
19-НОРТЕСТОСТЕРОНУ**

091 «Біологія»

09 «Біологія»

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

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

Е. Е. Романова

Науковий керівник
ЗАХАРЕНКО Микола Олександрович,
доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НААН

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Романова Е. Е. Активність ензимів та особливості обміну вуглеводів і ліпідів в тканинах риб за дії 19-нортестостерону. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 «Біологія». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2024.

Важлива роль у регуляції фізіологічних функцій та метаболічних процесів у кісткових риб належить стероїдним гормонам. Їх вміст в організмі риб регулюється гіпоталамо-гіпофізарно-ендокринною системою і залежить від низки екзогенних факторів, зокрема і від синтетичних стероїдних гормонів, що потрапляють у природні водойми після їх використання як анаболічних засобів, лікарських препаратів та стимуляторів репродуктивної функції тварин. Накопичуючись у воді, синтетичні стероїди впливають на структуру популяцій, статеву поведінку та відтворення риб, змінюють метаболічні процеси в тканинах. Встановлено вплив синтетичних стероїдів на фізіологічні функції, еритропоез, біосинтез протеїнів, ендогенних стероїдних і поліпептидних гормонів, активність ензимів, окисне фосфорилування, накопичення АТФ і креатинфосфату в м'язах, реплікацію ДНК у тканинах теплокровних тварин. Однак, що стосується механізму впливу синтетичних стероїдів на процеси метаболізму, зокрема на активність ензимів, синтез ендогенних стероїдних гормонів, перетворення вуглеводів та ліпідів, перекисне окиснення ліпідів у тканинах кісткових риб, то він залишається до кінця не з'ясованим.

У дисертації наведено результати досліджень активності ензимів, вмісту гормонів, обміну вуглеводів і ліпідів, перекисного окиснення ліпідів у тканинах, фракційний склад білків плазми крові та гематологічні показники у риб за дії 19-нортестостерону, що розширило та поглибило розуміння механізму дії синтетичних стероїдних гормонів на метаболічні процеси в організмі кісткових риб.

Проведеними експериментами з'ясовано, що синтетичний стероїдний гормон 19-нортестостерон стимулює дихальну функцію у риб, підвищуючи кількість дихальних рухів через 3, 12 і 24 години їх експозиції у воді за концентрації 200 мкг/дм³, але не впливає на цей показник на початку експерименту, як і за вмісту у воді 50 мкг/дм³. У риб дослідних груп, порівнюючи з контролем, не встановлено змін живої ваги, довжини тіла, маси гепатопанкреасу та селезінки, їх індексу за дії 19-нортестостерону. У риб під впливом 19-нортестостерону не змінюється зовнішній покрив, колір луски, плавців, стан ротового отвору, очей та зябрових пелюсток.

За дії синтетичного стероїду 19-нортестостерону морфологічний склад крові у риб залишається без змін, не дивлячись на підвищення його концентрації у воді з 50 до 200 мкг/дм³. Концентрація гемоглобіну, кількість еритроцитів, лейкоцитів і тромбоцитів, а також співвідношення еозинофілів, сегментоядерних і паличкоядерних нейтрофілів, лімфоцитів і моноцитів у крові риб дослідних груп відповідала фізіологічним значенням. Встановлено зниження швидкості осідання еритроцитів у крові риб за концентрації 19-нортестостерону у воді 200 мкг/дм³, тоді як за низького вмісту гормону у воді цей показник не змінювався.

Синтетичний гормон 19-нортестостерон у тканинах риб стимулює реакції перекисного окиснення ліпідів та активність ензимів системи антиоксидантного захисту, значення яких залежали від концентрації 19-нортестостерону у воді. Встановлено підвищення концентрації малонового диальдегіду, дієнових кон'югатів у плазмі крові та гепатопанкреасі коропів дослідних груп, порівнюючи з контролем. У плазмі крові та гепатопанкреасі риб дослідних груп за дії 19-нортестостерону підвищувалась каталазна і супероксиддисмутазна активності, не дивлячись на те, що вміст гідроперекисів ліпідів не змінювався. Виявлено підвищення вмісту дієнових кон'югатів та супероксиддисмутазної активності в гепатопанкреасі коропів із збільшенням концентрації 19-нортестостерону у воді до 200 мкг/дм³ за відсутності впливу на вміст

малонового диальдегіду і каталазну активність, порівнюючи з показниками у риб за рівня синтетичного стероїду у воді 50 мкг/дм³.

З'ясовано вплив синтетичного стероїду 19-нортестостерону на метаболічні процеси в тканинах риб, перебіг яких залежить від його концентрації у воді і пов'язаний із зміною вмісту ендогенних стероїдних гормонів у тканинах. Синтетичний стероїд 19-нортестостерон за концентрації у воді 50 мкг/дм³ не впливав, а за 200 мкг/дм³ підвищував вміст тестостерону, знижував вміст прогестерону і кортизолу в плазмі крові, збільшував рівень тестостерону, прогестерону і кортизолу в гепатопанкреасі риб, порівнюючи з показниками риб контрольної групи. Встановлено значне зростання вмісту ендогенних стероїдних гормонів тестостерону, прогестерону і кортизолу у гепатопанкреасі, за одночасного підвищення рівня тестостерону і зниження прогестерону і кортизолу в плазмі крові риб за збільшення концентрації 19-нортестостерону у воді з 50 до 200 мкг/дм³. На основі одержаних результатів зроблено висновок, що одним із шляхів впливу синтетичних стероїдів на метаболічні процеси в організмі кісткових риб є зміна концентрації ендогенних стероїдних гормонів – регуляторів активності ензимів у клітинах.

Встановлено вплив синтетичних стероїдів на вміст протеїнів, активність ензимів, обмін вуглеводів та ліпідів, фосфорорганічних сполук, рівень неорганічного фосфору і заліза в тканинах риб. Доведено, що синтетичний стероїд 19-нортестостерон проявляє в організмі кісткових риб анаболічний ефект, який залежить від концентрації 19-нортестостерону у воді, підвищує вміст протеїну та альбумінів у плазмі крові коропів дослідних груп. В експерименті не встановлено вплив синтетичного стероїду на вміст глюкози, тригліцеридів і креатиніну в плазмі крові риб за концентрації 19-нортестостерону у воді 50 мкг/дм³. За вмісту стероїду у воді 200 мкг/дм³ концентрація глюкози в плазмі крові знижується, що вказує на посилення енергетичних процесів, не дивлячись на сталий рівень тригліцеридів і креатиніну.

Стимулюючий вплив 19-нортестостерону на біосинтетичні процеси в тканинах риб за концентрації у воді 50 і 200 мкг/дм³ підтверджено збільшенням

вмісту протеїнів, зокрема альбумінів, в гепатопанкреасі риб дослідних груп, порівнюючи з контролем. Експериментами доведено стимулюючий вплив синтетичних стероїдів на глікогеногенез і синтез тригліцеридів у тканинах риб, на що вказує підвищення вмісту глюкози, тригліцеридів і креатиніну в гепатопанкреасі риб дослідних груп як за низької, так і високої концентрації 19-нортестостерону у воді. За дії досліджуваного стероїдного гормону концентрація неорганічного фосфору та заліза в гепатопанкреасі, як і в плазмі крові риб дослідних груп, зростала, а кальцію – не змінювалась. В експерименті не встановлено відмінностей за цими показниками у риб дослідних груп, незважаючи на значну різницю у концентрації 19-нортестостерону у воді.

Дослідженнями показано, що одним із механізмів впливу синтетичних стероїдів на метаболізм в організмі кісткових риб є зміна активності низки ензимів у тканинах. У плазмі крові риб за перебування у воді з концентрацією 19-нортестостерону 50 мкг/дм^3 підвищувалась креатинфосфокіназна і аспартатамінотрансферазна активності, знижувалась лужнофосфатазна і аланінамінотрансферазна активності, а лактатдегідрогеназна – не змінювалась. Гормон 19-нортестостерон за концентрації у воді 200 мкг/дм^3 підвищував креатинфосфокіназну і аспартатамінотрансферазну активності, але знижував лужнофосфатазну і аланінамінотрансферазну активності.

Виявлено вплив синтетичних стероїдів на гідролітичні, окисно-відновні процеси та реакції переамінування амінокислот у тканинах риб, про що свідчить зміна активності ензимів у надосадовій фракції і мітохондріях гомогенату гепатопанкреаса. У риб за концентрації 19-нортестостерону 50 мкг/дм^3 зростала лактатдегідрогеназна, креатинфосфокіназна, лужнофосфатазна, аланінамінотрансферазна й аспартатамінотрансферазна активності у надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса, порівнюючи з контролем. Висока концентрація 19-нортестостерону у воді (200 мкг/дм^3) навпаки знижувала лужнофосфатазну та креатинфосфокіназну активності у надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса, не впливала на активність інших ензимів,

що свідчить про гальмування гідролітичних і енергетичних процесів у тканинах риб.

Синтетичний стероїд 19-нортестостерон за концентрації у воді 50 і 200 мкг/дм³ підвищував лактатдегідрогеназну і глюкозо-6-фосфатазну активності у супернатанті гомогенату гепатопанкреаса коропів, а в мітохондріальній фракції – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназну та ізоцитратдегідрогеназну активності, порівнюючи з контролем.

Виявлено зміну фракційного складу та електрофоретичної рухливості білків плазми крові риб за дії 19-нортестостерону. Досліджуваний стероїд за концентрації у воді 50 мкг/дм³ підвищував вміст білків з молекулярною масою 240–231, 215–179, 169–146 і 104–95 кДа, знижував з молекулярною масою 35 – 33 кДа і не впливав на рівень протеїнів інших фракцій. Крім того у плазмі крові риб виявлено фракції білків з молекулярною масою 228–220, 116–105 і 48–44 кДа, які були відсутні у коропів контрольної групи.

Підвищення концентрації стероїдного гормону 19-нортестостерону у воді до 200 мкг/дм³ збільшувало в плазмі крові риб вміст білків з молекулярною масою 240–231 і 215–179 кДа, одночасно зменшуючи рівень протеїнів з молекулярною масою 35–33 кДа, порівнюючи з контролем. Встановлено зміни фракційного складу білків плазми крові риб за впливу різної концентрації 19-нортестостерону у воді, які пов'язані із зниженням вмісту білків з молекулярною масою 228–220, 169–146 і 104–95 кДа та підвищенням рівня протеїнів з молекулярною масою 48–44 кДа. Крім того у плазмі крові риб другої дослідної групи, порівнюючи з першою, відсутні окремі фракції протеїнів з молекулярною масою 169–146, 104–95 і 48–44 кДа. На підставі одержаних результатів можна зробити висновок про те, що 19-нортестостерон впливає не тільки на біосинтез білків у гепатопанкреасі, але й змінює електрофоретичну рухливість білків плазми крові риб.

За концентрації 19-нортестостерону у воді 50 мкг/дм³ і його тривалого впливу вміст кортизолу, прогестостерону, тестостерону, глюкози, білка, креатиніну, неорганічного фосфору в плазмі крові не змінювався, рівень кальцію

підвищувався, а лактатдегідрогеназна активність зростала. У гепатопанкреасі риб підвищувалась концентрація кортизолу, глюкози, білка і лактатдегідрогеназна активність, знижувалась креатинфосфокіназна активність за сталого рівня прогестерону і тестостерону та метаболітів обміну глюкози, ліпідів, білків та амінокислот.

За концентрації 19-нортестостерону у воді 200 мкг/дм³ у плазмі крові і гепатопанкреасі риб підвищувався вміст ендogenous стероїдів, зростала лактатдегідрогеназна, аланінамінотрансферазна, аспартатамінотрансферазна і креатинфосфокіназна активності у плазмі крові, а в гепатопанкреасі підвищувався вміст глюкози, білка, тригліцеридів, креатиніну, неорганічного фосфору, збільшувалась аланінамінотрансферазна і аспартатамінотрансферазна активності, знижувалась креатинфосфокіназна активність.

Отже, як встановлено дослідженнями, в основі механізму впливу синтетичних стероїдів на метаболізм в організмі кісткових риб лежить їх здатність впливати на вміст ендogenous стероїдних гормонів, метаболіти проміжного обміну вуглеводів та ліпідів, посилювати активність низки ензимів енергетичного обміну та системи антиоксидантного захисту, процеси перекисного окиснення ліпідів у тканинах, змінювати фракційний склад білків плазми крові.

Ключові слова: стероїдні гормони, короп, кров, гепатопанкреас, ензими, метаболізм, протеїни, вуглеводи, ліпіди.

ANNOTATION

Romanova E. E. Enzyme activity and the features of carbogydrate and lipids metabolism in fish tissues under the influence of 19-nortestosterone.
Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for the Doctor of Philosophy degree in specialty 091 «Biology».
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2024.

Steroid hormones play an important role in the regulation of physiological

functions and metabolic processes in the body of bony fish. Their content in the body of fish is regulated by the hypothalamic-pituitary-endocrine system and depends on a number of exogenous factors, including synthetic steroid hormones that enter natural reservoirs after their use as anabolic agents, drugs and animal productivity stimulants. Accumulating in water, synthetic steroids affect the structure of populations, sexual behavior and reproduction of fish, change metabolic processes in tissues. The influence of synthetic steroids on physiological functions, erythropoiesis, biosynthesis of proteins, endogenous steroid and polypeptide hormones, enzyme activity, oxidative phosphorylation, accumulation of ATP and creatine phosphate in muscles, DNA replication in the tissues of warm-blooded animals was established. However, as regards the mechanism of the effect of synthetic steroids on the metabolic process, in particular on the content of endogenous steroid hormones, the conversion of carbohydrates and lipids, the activity of enzymes, and LPO in the tissues of bony fish, it remains to be fully elucidated.

The dissertation presents the results of studies of the content of hormones in tissues, the activity of enzymes of the metabolism of carbohydrates, lipids, certain mineral substances, lipid peroxidation, the fractional composition of blood plasma proteins and hematological indicators in fish under the influence of 19-nortestosterone, which expanded and deepened the understanding of the mechanism of action of synthetic steroid hormones on metabolic processes in the body of bony fish.

The conducted experiments revealed that the synthetic steroid hormone 19-nortestosterone stimulates the respiratory function of fish, increasing the number of respiratory movements in fish through 3, 12 and 24 hours of exposure in water at a concentration of $200 \mu\text{g}/\text{dm}^3$, but does not affect this indicator at the beginning of the experiment, as well as at a water content of $50 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Compared to control fish, there were no changes in live weight, body length, weight of the hepatopancreas and spleen, and their index under the influence of 19-nortestosterone. No effect of 19-nortestosterone on the outer coat of fish, the color of scales, fins, the condition of the mouth, eyes and gill petals was also found.

In the fish of the research groups, the morphological composition of the blood

remains unchanged under the influence of the synthetic steroid 19-nortestosterone, despite the increase in its concentration in water from 50 to 200 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. The concentration of hemoglobin, the number of erythrocytes, leukocytes and platelets, as well as the ratio of eosinophils, segmented and rod-shaped neutrophils, as well as lymphocytes and monocytes in the blood of the fish of the experimental groups corresponded to physiological values. A decrease in the sedimentation rate of erythrocytes in the blood of fish was established at a concentration of 19-nortestosterone in water of 200 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, while this indicator did not change at a low concentration of the hormone in water.

The synthetic hormone 19-nortestosterone affected lipid peroxidation and the activity of enzymes of the antioxidant defense system in fish tissues, the values of which depended on the concentration of 19-nortestosterone in water. An increase in the concentration of malondialdehyde, diene conjugates in the blood plasma and hepatopancreas of the carp of the experimental groups was established compared to the control. Catalase and superoxide dismutase activity increased under the influence of 19-nortestosterone in the blood plasma and hepatopancreas of fish of the experimental groups, despite the fact that the content of lipid hydroperoxides did not change. An increase in the content of diene conjugates and superoxide dismutase activity in the hepatopancreas of carp was revealed with an increase in the concentration of 19-nortestosterone in water up to 200 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ in the absence of an effect on the content of malondialdehyde and catalase activity compared to the indicators in fish at a level of synthetic steroid in water of 50 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$.

The influence of the synthetic steroid 19-nortestosterone on metabolic processes in fish tissues, the course of which depends on its concentration in water and is associated with changes in the content of endogenous steroid hormones in tissues, has been clarified. The synthetic steroid 19-nortestosterone at a concentration in water of 50 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ had no effect, but at a concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ it increased the testosterone content, decreased progesterone and cortisol in the blood plasma, and increased the level of testosterone, progesterone and cortisol in the hepatopancreas of fish relative to the indicators in carp of the control group. A significant increase

in the content of endogenous steroid hormones testosterone, progesterone and cortisol in the hepatopancreas was established, with a simultaneous increase in the level of testosterone and a decrease in progesterone and cortisol in the blood plasma of fish with an increase in the concentration of 19-nortestosterone in water from 50 to 200 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Based on the obtained results, it was concluded that one of the ways of the influence of synthetic steroids on metabolic processes in the body of bony fish is a change in the concentration of endogenous steroid hormones - regulators of enzyme activity in cells.

The effect of synthetic steroids on protein content, activity of carbohydrate and lipid metabolism enzymes, organophosphorus compounds, inorganic phosphorus and iron levels in fish tissues was established. It has been proven that the synthetic steroid 19-nortestosterone has an anabolic effect in the body of bony fish, which depends on the concentration of 19-nortestosterone in the water, and increases the content of protein and albumin in the blood plasma of the carp of the research groups. The experiment did not establish the influence of the synthetic steroid on the content of glucose, triglycerides and creatinine in the blood plasma of fish at a concentration of 19-nortestosterone in water of 50 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. With a steroid content of 200 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ in water, the concentration of glucose in the blood plasma decreases, which indicates an increase in energy processes, despite the constant level of triglycerides and creatinine.

The stimulating effect of 19-nortestosterone on biosynthetic processes in fish tissues at concentrations in water of 50 and 200 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ was confirmed by an increase in the content of proteins, including albumins, in the hepatopancreas of fish of the experimental groups compared to the control. Experiments proved the stimulating effect of synthetic steroids on gluconeogenesis and synthesis of triglycerides in fish tissues, as indicated by an increase in the content of glucose, triglycerides and creatinine in the hepatopancreas of fish of the experimental groups both at low and high concentrations of 19-nortestosterone in water. Under the influence of the studied steroid hormone, the concentration of inorganic phosphorus and iron in the hepatopancreas, as well as in the blood plasma of the fish of the experimental groups,

increased, while calcium did not change. In the experiment, no differences in these indicators were found in the fish of the experimental groups, despite the significant difference in the concentration of 19-nortestosterone in the water.

Studies have shown that one of the mechanisms of the effect of synthetic steroids on the metabolism in the body of bony fish is a change in the activity of a number of enzymes in the tissues. In the blood plasma of fish when they were in water with a concentration of 19-nortestosterone of $50 \mu\text{g}/\text{dm}^3$, creatine phosphokinase and aspartate aminotransferase activity increased, alkaline phosphatase and alanine aminotransferase activity decreased, and lactate dehydrogenase did not change. The hormone 19-nortestosterone at a concentration in water of $200 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ caused an increase in creatine phosphokinase and aspartate aminotransferase activity, but decreased alkaline phosphatase and alanine aminotransferase activity.

The effect of synthetic steroids on hydrolytic, redox processes and amino acid peramination reactions in fish tissues was also revealed, as evidenced by a change in the activity of enzymes in the supernatant fraction and mitochondria of the hepatopancreas homogenate. Lactate dehydrogenase, creatine phosphokinase, alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, and aspartate aminotransferase activity in the supernatant fraction of the hepatopancreas homogenate increased in fish at a concentration of 19-nortestosterone of $50 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ compared to the control. A high concentration of 19-nortestosterone in water ($200 \mu\text{g}/\text{dm}^3$), on the contrary, reduced alkaline phosphatase and creatine phosphokinase activity in the supernatant fraction of fish hepatopancreas homogenate, while it did not affect other enzymes, which indicates inhibition of hydrolytic and energetic processes in fish tissues.

The synthetic steroid 19-nortestosterone at concentrations in water of 50 and $200 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ increased lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphatase activity in the supernatant of carp hepatopancreas homogenate, and in the mitochondrial fraction – glucose-6-phosphate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase activity compared to the control.

A change in the fractional composition and electrophoretic mobility of fish blood plasma proteins under the influence of 19-nortestosterone was revealed. The studied

steroid at a concentration in water of $50 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ increased the content of proteins with a molecular weight of 240–231, 215–179, 169–146, and 104–95 kDa, decreased it with a molecular weight of 35–33 kDa, and did not affect the level of proteins in other fractions. In addition, fractions of proteins with a molecular weight of 228–220 were found in the blood plasma of fish; 116–105 and 48–44 kDa, which were absent in the carp of the control group.

Increasing the concentration of the steroid hormone 19-nortestosterone in water to $200 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ increased the content of proteins with a molecular weight of 240–231 and 215–179 kDa in the blood plasma of fish, while simultaneously reducing the level of proteins with a molecular weight of 35–33 kDa compared to the control. Features of the fractional composition of fish blood plasma proteins under the influence of different concentrations of 19-nortestosterone in water were revealed, which are associated with a decrease in the content of proteins with a molecular weight of 228–220, 169–146 and 104–95 kDa and an increase in the level of proteins with a molecular weight of 48–44 kDa. In addition, in the blood plasma of the fish of the second experimental group, compared to the first, there are no separate fractions of proteins with a molecular weight of 169–146; 104–95 and 48–44 kDa. Based on the obtained results, it can be concluded that 19-nortestosterone affects not only the biosynthesis of proteins in the hepatopancreas, but also changes the electrophoretic mobility of fish blood plasma proteins.

So, as research has established, the basis of the mechanism of the effect of synthetic steroids on the metabolism in the body of bony fish lies in their ability to influence the content of endogenous steroid hormones, metabolites of intermediate carbohydrate and lipid metabolism, enhance the activity of a number of enzymes of energy metabolism and antioxidant protection systems, the processes of lipid peroxidation in tissues, change the fractional composition of blood plasma proteins.

At a concentration of 19-nortestosterone in water of $50 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ and its long-term exposure, the content of cortisol, progesterone, testosterone, glucose, protein, creatinine, inorganic phosphorus in the blood plasma did not change, the level of calcium and lactate dehydrogenase activity increased, and

gammaglutamyltransferase, on the contrary, decreased relative to the control. In the hepatopancreas of fish, an increase in the concentration of cortisol, glucose, protein, lactate dehydrogenase activity, a decrease in creatine phosphokinase activity at a constant level of progesterone and testosterone and metabolites of glucose, lipid, protein and amino acid metabolism was established.

In fish, at a concentration of 19-nortestosterone in water of 200 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ in the blood plasma and hepatopancreas, the content of endogenous steroids, lactate dehydrogenase, alanine- and aspartate aminotransferase, and creatine phosphokinase activity in the blood plasma increased, and in the hepatopancreas, the content of glucose, protein, triglycerides, creatinine, inorganic phosphorus, alanine and aspartate aminotransferase activity, while creatine phosphokinase activity decreased.

So, as research has established, the basis of the mechanism of the effect of synthetic steroids on the metabolism in the body of bony fish lies in their ability to influence the content of endogenous steroid hormones, metabolites of intermediate carbohydrate and lipid metabolism, enhance the activity of a number of enzymes of energy metabolism and antioxidant protection systems, the processes of lipid peroxidation in tissues, change the fractional composition of blood plasma proteins.

Key words: steroid hormones, carp, blood, hepatopancreas, enzymes, metabolism, proteins, carbohydrates, lipids.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Стаття у науковому виданні, включеному до міжнародних наукометричних баз даних Scopus та/або Web of Science Core Collection

1. Захаренко М. О., Романова Е. Е. Вплив 19-нортестостерону на вміст стероїдних гормонів, гематологічні показники та окремі ланки метаболізму в тканинах коропа (*Cyprinus carpio* L.). Гідробіологічний журнал. 2024. Т. 60. № 2. С. 95–107.

Статті у наукових фахових виданнях України

2. **Романова Е. Е.**, Захаренко М. О. Активність ензимів метаболізму вуглеводів і амінокислот та перекисне окиснення ліпідів в тканинах коропа за дії 19-нортестостерону. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). 2023. Т. 15. Вип. 2. С. 122–129.

3. Захаренко М. О., **Романова Е. Е.** Білки плазми крові та вміст метаболітів обміну вуглеводів і ліпідів в гепатопанкреасі риб за дії 19-нортестостерону. Science Rise: Biological Science. 2023. № 4 37). С. 19–24.

Науково-практичні рекомендації

4. Захаренко М. О., Курбатова І. М., Поляковський В. М., Заєць Н. А., Чепіль Л. В., **Романова Е. Е.** Оцінка екологічного стану ставів, забруднених стічними водами тваринницьких підприємств: науково-практичні рекомендації. Київ: НУБіП України, 2022. 22 с.

Тези наукових доповідей

5. Захаренко М. О., **Романова Е. Е.**, Курбатова І. М., Поляковський В. М. Вміст гормонів та метаболітів проміжного обміну в плазмі крові риб за дії нандролону. Іновації в житті людей: XII Міжнародна наукова конференція, 8–10 червня 2022 року: тези доповіді. Манчестер, Великобританія, 2022. С. 52.

6. **Романова Е. Е.**, Захаренко М. О., Курбатова І. М. Фракційний склад білків плазми крові риб за різної концентрації нандролону у воді. Сучасна наука: іновації та очікування: X Міжнародна науково-практична конференція, 22–27 червня 2022 року: тези доповіді. Стокгольм. Швеція, 2022. С. 35.

7. **Романова Е. Е.**, Курбатова І. М., Захаренко М. О. Вміст ендогенних стероїдів та активність ензимів антиоксидантного захисту в тканинах риб за дії 19-нортестостерону. Сучасні екологічні виклики в Україні та світі: перша всеукраїнська науково-практична конференція, 21–22 березня 2024 року: тези доповіді. Київ, 2024. С. 49–52.

8. Захаренко М. О., Курбатова І. М., **Романова Е. Е.** Активність ензимів обміну вуглеводів та вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів в тканинах риб за різної концентрації 19-нортестостерону у воді. V International Scientific and Practical Conference, 15–17 April 2024: report theses. Vienna, Austria, 2024. С. 21–25.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І СКОРОЧЕНЬ	18
ВСТУП	19
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	25
1.1. Стероїдні гормони та їх роль у регуляції фізіологічних функцій і метаболізму у кісткових риб	25
1.1.1. Вплив стероїдних гормонів на обмін речовин у тканинах риб	25
1.1.2. Активність ензимів у тканинах риб за дії стероїдних гормонів	34
1.2. Характеристика синтетичних стероїдів та їх вплив на метаболічні процеси в тканинах риб	38
1.2.1. Обмін речовин у тканинах риб за дії синтетичних стероїдів	38
1.2.2. Вплив синтетичних стероїдних гормонів на активність ензимів та ПОЛ в тканинах риб	45
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	50
2.1. Схема дослідів та умови їх проведення	50
2.2. Методи дослідження	54
2.2.1. Визначення живої маси та індексів внутрішніх органів риб	54
2.2.2. Дослідження гематологічних показників	54
2.2.3. Визначення показників обміну вуглеводів, ліпідів та мінеральних речовин	55
2.2.4. Дослідження активності ензимів	58
2.2.5. Визначення показників ПОЛ	61
2.2.6. Визначення показників антиоксидантного захисту	62
2.2.7. Визначення концентрації гормонів	63
2.2.8. Дослідження вмісту та фракційного складу білків	63
2.2.9. Статистична обробка результатів	64
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	65
3.1. Вплив 19-нортестостерону на зовнішні ознаки, масу внутрішніх органів і гематологічні показники риб	65
3.2. Вміст стероїдних гормонів та перекисне окиснення ліпідів у тканинах риб за впливу 19-нортестостерону	70
3.3. Показники обміну вуглеводів, ліпідів та вміст макро- і мікроелементів у тканинах риб за впливу 19-нортестостерону	75

3.4. Активність ензимів у тканинах риб за дії 19-нортестостерону	80
3.5. Фракційний склад білків плазми крові за дії 19-нортестостерону	85
3.6. Особливості метаболічних процесів у тканинах риб за тривалого впливу 19-нортестостерону	88
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	95
ВИСНОВКИ	109
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	112
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	113

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І СКОРОЧЕНЬ

АДФ – аденозіндифосфорна кислота

АЛТ – аланінамінотрансфераза

АМФ – аденозінмонофосфорна кислота

АСТ – аспартатамінотрансфераза

АТФ – аденозінтрифосфорна кислота

Гл-6-ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа

Гл-6-Фаза – глюкозо-6-фосфатаза

ДК – дієнові кон'югати

ЩДГ – ізоцитратдегідрогеназа

ІФА – імуноферментний аналіз

КТ – каталаза

КФК – креатинфосфокіназа

ЛДГ – лактатдегідрогеназа

ЛФ – лужна фосфатаза

МДА – малоновий диальдегід

НАД⁺ – нікотинамідаденіндинуклеотид (окислений)

НАДФ⁺ – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (окислений)

ПААГ – поліакриламідний гель

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

СДГ – сукцинатдегідрогеназа

СОД – супероксиддисмутаза

Тг – тригліцериди

Тс – тестостерон

ХЕ – холінестераза

ВСТУП

Актуальність теми. У кісткових риб стероїдні гормони є важливими регуляторами фізіологічних функцій в організмі та метаболічних процесів у тканинах [63, 94, 140]. Синтезуються стероїдні гормони в інтерреналових клітинах нирок під контролем гіпоталамо-гіпофізарної системи [94, 117]. На синтез стероїдних гормонів у тканинах впливає сезон року, вид, вік та стать риб, а також низка стрес-факторів, особливо ксенобіотики антропогенного походження [56, 94, 113, 148]. У риб стероїдні гормони регулюють ембріональний розвиток, диференціацію статі, розмноження, циркадні ритми та імунну і стресову відповідь, стимулюють утворення статевих продуктів та змінюють поведінку під час нересту [56, 94, 117]. Механізм впливу стероїдних гормонів на внутрішньоклітинний метаболізм включає їх взаємодію з білками-рецепторами цитоплазми та ядра клітин органів-мішеней, утворення гормон-рецепторного комплексу, впливом на транскрипцію генів, стимуляцію синтезу та активності низки ензимів вуглеводного та енергетичного обміну [94, 117, 146]. На концентрацію та метаболічну активність ендогенних гормонів у риб впливають екзогенні стероїди, зокрема естрон, 17β -естрадіол, 17β -етенілестрадіол, а також синтетичний стероїд 19-нортестостерон, які знаходять у природних водоймах [14, 27, 76, 95]. Встановлено, що 19-нортестостерон у тварин володіє анаболічним ефектом, стимулює біосинтез протеїнів у тканинах, синтез тестостерону, впливає на процес згортання крові та ліпідний профіль плазми крові, реабсорбцію води і натрію в нирках [53, 73, 147]. Він стимулює реакції енергетичного обміну, накопичення АТФ і креатинфосфату в м'язах, впливає на вміст протеїнів і фракційний склад білків плазми крові, активність та синтез поліпептидних гормонів [12, 13, 147]. Метаболізується 19-нортестостерон у печінці за участю ензимів перетворення ендогенного тестостерону шляхом реакцій гідроксилювання з утворенням 19-норандростерону, 19-норепіандростерону і 19-норетіохоланолону.

Однак, не дивлячись на встановлені шляхи впливу синтетичних екзогенних стероїдів на метаболічні процеси у теплокровних тварин механізм їх дії

у кісткових риб залишається до кінця не з'ясованим, особливо щодо їх впливу на активність ензимів обміну вуглеводів, ліпідів, перекисне окиснення ліпідів, систему антиоксидантного захисту, вміст стероїдних гормонів у тканинах.

Зв'язок роботи з науковими програмами. Дисертація є складовою частиною науково-дослідної теми: «Розробити систему контролю та відновлення екологічної рівноваги природних водойм забруднених побічними продуктами тваринництва» (номер державної реєстрації 0121U110189), що виконувалась співробітниками кафедри ветеринарної гігієни імені професора А. К. Скороходька Національного університету біоресурсів і природокористування України впродовж 2021–2022 рр.

Мета та завдання дослідження. Мета дисертаційного дослідження – з'ясувати вплив синтетичного стероїду 19-нортестостерону на вміст ендогенних гормонів, активність ензимів обміну вуглеводів, ліпідів, антиоксидантного захисту, ПОЛ у тканинах та фракційний склад білків плазми крові у кісткових риб.

Для досягнення поставленої мети було передбачено вирішення таких завдань:

- дослідити морфологічний склад крові та стан внутрішніх органів риб за короткого терміну впливу 19-нортестостерону;
- визначити вміст стероїдних гормонів у плазмі крові та гепатопанкреасі риб за короткого терміну впливу 19-нортестостерону;
- дослідити показники перекисного окиснення ліпідів та активність ензимів антиоксидантного захисту у плазмі крові та гепатопанкреасі риб за короткого терміну впливу 19-нортестостерону;
- з'ясувати вплив 19-нортестостерону на вміст метаболітів вуглеводного ліпідного та мінерального обміну в тканинах риб;
- визначити активність ензимів обміну вуглеводів та окремих амінокислот у тканинах риб за короткого терміну впливу 19-нортестостерону;
- дослідити вміст та фракційний склад білків у плазмі крові риб за короткого терміну впливу 19-нортестостерону;

- визначити показники обміну речовин та активність ензимів у плазмі крові та гепатопенкреасі риб за тривалого впливу 19-нортестостерону;
- дослідити вміст гормонів у плазмі крові та гепатопенкреасі риб за тривалого впливу 19-нортестостерону;
- розробити практичні рекомендації з контролю природної рівноваги водойм, забруднених стічними водами тваринницьких підприємств.

Об'єкт дослідження – вміст стероїдних гормонів, показники метаболізму вуглеводів, ліпідів, амінокислот, ПОЛ, активність ензимів у тканинах, морфологічний склад крові, фракційний склад білків плазми крові дворічок коропа.

Предмет дослідження – вплив синтетичного стероїдного гормону 19-нортестостерону на вміст стероїдних гормонів, процеси ПОЛ, обмін вуглеводів, ліпідів, амінокислот, активність ензимів у тканинах, морфологічний склад крові, вміст та фракційний склад білків плазми крові дворічок коропа.

Методи досліджень – спектрофотометричні (показники обміну вуглеводів, ліпідів, макро– і мікроелементів, активність ензимів), імуноферментні (стероїдні гормони), електрофоретичні (білки плазми крові), гематологічні (морфологія крові), іхтіологічні (маса та проміри тіла риб), статистичні та математичні (обробка результатів досліджень).

Наукова новизна одержаних результатів полягає у з'ясуванні ролі синтетичного стероїду 19-нортестостерону в регуляції активності ензимів обміну вуглеводів, ліпідів, протеїнів, окремих амінокислот, впливу на процес перекисного окиснення ліпідів, вміст ендогенних стероїдних гормонів, що поглиблює розуміння механізму дії синтетичних стероїдів в організмі кісткових риб.

Встановлено, що 19-нортестостерон за низької концентрації у воді і нетривалої дії не впливає, а за високого вмісту підвищує кількість дихальних рухів, рівень кортизолу, протеїну, глюкози, тригліцеридів, неорганічного фосфору та заліза, лужнофосфатазну, лактатдегідрогеназну, глюкозо-6-фосфатазну, креатинфосфокіназну, аспартатамінотрансферазну

і аланінамінотрансферазну активності у плазмі крові та цитоплазмі, ізоцитратдегідрогеназну і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназну активності у мітохондріях, вміст тестостерону і прогестерону в гепатопанкреасі за сталих значень морфологічного складу крові, маси тіла та внутрішніх органів.

Синтетичний стероїд 19-нортестостерон стимулює у коропів перекисне окиснення ліпідів, активує ензими антиоксидантного захисту, впливає на біосинтез протеїнів у гепатопанкреасі та фракційний склад білків плазми крові.

19-нортестостерон за тривалої дії і низької концентрації у воді збільшує вміст протеїнів і альбумінів, неорганічного фосфору та заліза в гепатопанкреасі риб, а також лактатдегідрогеназну активність та вміст кальцію в плазмі крові, за сталого рівня протеїну, глюкози, тригліцеридів, креатиніну і сечовини.

За високої концентрації у воді і тривалої дії 19-нортестостерон підвищує в плазмі крові риб вміст тестостерону, лактатдегідрогеназну і аланінамінотрансферазну активності, а в гепатопанкреасі – концентрацію тестостерону, прогестерону і кортизолу, вмісту глюкози, білка, тригліцеридів, креатиніну, неорганічного фосфору, аланінамінотрансферазну і аспаратамінотрансферазну активності. Стероїд знижує рівень кортизолу, прогестерону та аспаратамінотрансферазну активність у плазмі крові і не впливає на вміст глюкози, протеїну, тригліцеридів, холестерину, сечовини, креатиніну, кальцію і неорганічного фосфору.

Практичне значення отриманих результатів. Результати досліджень щодо впливу екзогенного стероїдного гормону 19-нортестостерону на риб розкривають важливу роль вуглеводів, ліпідів, протеїнів і окремих амінокислот, а також ендогенних гормонів, компонентів перекисного окиснення ліпідів та активності ензимів антиоксидантного захисту в механізмах адаптації кісткових риб до дії синтетичних стероїдів у воді. Одержані дані можуть бути використані як біохімічні критерії для оцінки екологічного стану природних водойм забруднених синтетичними стероїдними гормонами.

Результати досліджень використано під час розробки науково-практичних

рекомендацій «Оцінка екологічного стану природних водойм забруднених побічними продуктами тваринництва», затверджених вченою радою Національного університету біоресурсів і природокористування України (протокол № 4 від 23 листопада 2022 року). Одержані дані можуть бути використані для підготовки фахівців освітнього ступеня бакалавр спеціальності «Водні біоресурси та аквакультура» під час викладання дисципліни «Фізіологія і біохімія гідробіонтів», а також у науковій роботі для подальших досліджень впливу ксенобіотиків антропогенного походження на гідробіонтах.

Особистий внесок здобувача. Дисертантка самостійно здійснила пошук та аналіз фахової літератури за темою дисертації, розробила схеми проведення дослідів, провела експериментальні дослідження з визначення показників метаболізму вуглеводів, ліпідів, активності ензимів, вмісту гормонів, продуктів ПОЛ, фракційного складу білків плазми крові, обробила та теоретично обгрунтувала отримані результати, статистично опрацювала результати досліджень, підготувала матеріали до публікації у наукових виданнях, написала дисертацію. Аналіз та узагальнення результатів експериментальних досліджень та формування висновків проведено спільно з науковим керівником.

Апробація результатів дослідження дисертації. Результати досліджень дисертаційної роботи були представлені на: Міжнародній науковій конференції «Глобальні виклики ветеринарної медицини XXI століття» (м. Київ, 11 листопада 2021 року); XII Міжнародній науковій конференції «Інновації в житті людей» (Манчестер, 8–10 червня 2022 року); X Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасна наука: інновації та очікування» (Стокгольм, 22–27 червня 2022 року); XII International Scientific and Practical Conference «Modern scientific research: achievements, innovations and development prospects» (Berlin, 22–24 May 2022); X International Scientific and Practical Conference «Innovations and prospects of world science» (Vancouver, 25–27 May 2022); I Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні екологічні виклики в Україні та світі» (м. Київ, 21–22 березня 2024 року); V International Scientific and Practical Conference (Vienna, 15–17 April 2024).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 8 наукових праць, з яких стаття у науковому виданні, включеному до міжнародних наукометричних баз даних Scopus та/або Web of Science Core Collection, 2 статті у наукових фахових виданнях України, науково-практичні рекомендації, 4 тези наукових доповідей.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Стероїдні гормони та їх роль у регуляції фізіологічних функцій і метаболізму у кісткових риб

1.1.1. Вплив стероїдних гормонів на обмін речовин у тканинах риб

Регуляція фізіологічних функцій в організмі риб і метаболізму в тканинах – це складний багатоступеневий процес, що відбувається за участю центральної нервової системи, залоз внутрішньої секреції, циклічних нуклеотидів, простагландинів, ферментних систем, метаболітів та низькомолекулярних сполук [35, 94, 117,140]. Вавжлива роль у регуляції метаболізму в тканинах кісткових риб належить стероїдним гормонам та гормоноподібним сполукам, які утворюються в інтерреналових клітинах нирок [63, 94, 146]. У риб інтерреналові клітини входять до складу головної нирки і продукують кортикостероїди та статеві гормони [63, 94]. Основними стероїдними гормонами у кісткових риб є глюкокортикоїди та статеві гормони – андрогени і естрогени. У риб статеві гормони регулюють ембріональний розвиток, диференціацію статі, розмноження, метаболізм, циркадні ритми, імунну і стресову відповідь, стимулюють утворення статевих продуктів та змінюють поведінку під час нересту [94, 117,140, 142]. В основі будови молекули стероїдних гормонів лежить циклічний вуглеводень циклопентанпергідрофенантрен до атомів вуглецю якого приєднано окремі радикали та функціональні групи [35, 94]. Синтезуються кортикостероїди із холестеролу, який перетворюється за участю ряду ензимів у прегненолон. З нього шляхом окиснення оксигрупи в кетогрупу утворюється прогестерон. Це стероїдний гормон, який синтезується в статевих залозах теплокровних тварин, а у кісткових риб в інтерреналових клітинах нирок і статевими залозами [63, 94]. У риб прогестерон регулює статеві цикли, впливаючи на метаболічні процеси в тканинах [142, 146]. Він є попередником глюкокортикоїдів, зокрема кортизолу, одного із важливих маркерів стресових станів у риб [63, 94]. Його концентрація

в тканинах підвищується у відповідь на введення стероїдних гормонів, або за перебування риб у воді з високим вмістом синтетичних стероїдів, зокрема 19-нортестостерону [94]. Синтезується кортизол у риб в цитоплазмі інтерреналових клітин головної нирки. Спочатку в мітохондріях утворюється прегненолон, який потрапляє в цитоплазму де окиснюється в 17-он-прегненолон, а потім перетворюється в мітохондріях в 17-он-прогестерон. Він є попередником 11-деоксикортизолу з якого і утворюється кортикоїдний гормон кортизол [94]. У кісткових риб кортизол активує утворення та використання енергії, впливає на гомеостаз, бере участь у їх адаптації до дії стрес-факторів [61, 94]. Він стимулює реакції глікогенолізу в гепатопанкреасі кісткових риб із неуглеводних попередників у відповідь на дію стрес-факторів. Кортизол сприяє накопиченню глікогену в гепатопанкреасі, підвищує концентрацію глюкози в крові і знижує її окиснення в м'язах. Крім того кортикостероїди володіють в організмі протизапальною, протиалергічною, антиоксидантною, імунодепресивною та антитоксичною дією [61, 94]. У кісткових риб кортизол підтримує енергетичний баланс, контролює імунну систему, впливає на ріст і розмноження. Він також функціонує як мінералокортикоїд, оскільки у кісткових риб альдостерон не утворюється [73]. Концентрація кортизолу в плазмі крові риб за різних стресів збільшується до 40–100 нг/мл [94]. На вміст кортизолу та інших стероїдних гормонів у тканинах різних видів риб впливає забруднення води ксенобіотиками, зокрема гербіцидами [19]. Кортизол бере участь у регуляції водно-сольового балансу в організмі, стимулюючи реабсорбцію натрію та сприяє виведенню калію із організму нирками [61].

Крім того із прогестерону утворюється 17 α -гідроксіпрогестерон, який за участю низки ензимів перетворюється на андростендіон та статевий гормон кісткових риб тестостерон [29, 141]. Під дією ферменту 5 α -редуктази із тестостерону утворюється дегідротестостерон, а з нього 11-кетотестостерон – основний андроген кісткових риб. Цей гормон контролює у риб статевий диморфізм, розвиток і диференціацію фенотипових ознак, утворення та дозрівання статевих клітин у період нересту. У кісткових риб із андрогенів

утворюються естрогени, статеві гормони самок, зокрема із андростендіону синтезується естрон, а із тестостерону 17- β -естрадіол [94]. Синтез стероїдних гормонів у кісткових риб контролюється гіпоталамо-гіпофізарно-міжнирковою системою і регулюється кортикотропін-релізінг фактором гіпоталамуса. Він діє на гіпофіз, стимулюючи утворення та вивільнення адренкортикотропіну (АКТГ) [94]. У риб АКТГ через кров надходить до нирок, потрапляє в інтерреналові клітини де стимулює утворення глюкокортикоїдів [117]. Вміст стероїдних гормонів у тканинах кісткових риб змінюється за різних стресових станів організму, що впливає на фізіологічні процеси, імунну відповідь, обмін речовин в організмі [69, 78, 111, 122]. Більшість стероїдних гормонів, особливо андрогени та їх синтетичні аналоги, володіють анаболічним ефектом, впливають на ріст м'язів, обмін вуглеводів, ліпідів, амінокислот, азотистих та фосфорорганічних сполук [15, 16, 26, 35, 67].

Синтетичні стероїди, змінюючи активність ензимів, впливають на метаболізм, стимулюють синтез протеїнів у м'язах, обмін вуглеводів, ліпідів, амінокислот, перекисне окиснення ліпідів та систему антиоксидантного захисту в печінці [8, 9, 12, 13, 64]. У риб стероїдні гормони впливають на розвиток статевих залоз, функціональний стан печінки, нирок, кістково-м'язову, ендокринну, серцево-судинну та кровотворні органи [130, 142, 144]. Встановлено вплив стероїдних гормонів на імунну систему риб. Вони зв'язуються з рецептор-залежними та рецептор-незалежними клітинами імунокомпетентних органів, змінюють імунну відповідь в організмі, особливо за дії різних ксенобіотиків води [49, 140]. Останні здатні гальмувати або активувати рецептори гормонів, розміщених на клітинах імунокомпетентних органів, впливати на біосинтез і метаболізм ендогенних стероїдних гормонів, або їх розподіл в організмі [71, 127]. Речовини, які негативно впливають на біосинтез та метаболізм гормонів, або діють як інгібітори відповідних ферментів їх перетворення, чи впливають на експресію відповідних генів, відносять до класу інгібіторів ендокринної системи [64, 71, 128]. Це підтверджено дослідженнями впливу різної концентрації 17- β -естрадіолу на стимуляцію рецептора естрогену в клітинах рибок даніо (*Danio*

rerio L.) [80]. У концентрації 10 нМ він активує низку генів, пов'язаних з регуляцією клітинних циклів, що призводить до посилення проліферації, пошкодження ДНК та нестабільності геному, а також ослаблення механізмів, які пригнічують неопластичні процеси [80].

Вплив естрогенів на кровоносну систему риб пов'язують з їх роллю у розвитку, підтримці та функціонуванні серцево-судинної системи багатьох видів хребетних. Досліджуючи вплив естрогенів на серцево-судинну систему рибок даніо (*Danio rerio* L.) та карася (*Carassius auratus* L.) встановлено, що серце і кровоносні судини мають розвинуті системи відповіді на дію естрадіолу на ключових стадіях розвитку [42]. У риб, які піддавалися впливу біфенольних сполук, що впливають на рецептори естрогенів, спостерігали порушення гемодинаміки міокарда, підвищення показників функціонування серцево-судинної системи та структурні зміни міокарда [59]. У досліді також виявлено наявність проапоптичних білків у тканинах риб. Негативний вплив бісфенолу А на кровоносну систему риб також підтверджено дослідженнями й інших авторів [96, 121]. Він суттєво впливав на тканини серця через естрогенові рецептори у трансгенних естроген-чутливих риб. У серці личинок риб на 14-ту добу після запліднення ікри виявлено зміни у співвідношенні скорочень шлуночка та значне зниження частоти серцевих скорочень. Однак негативний вплив бісфенолу А на морфологічний склад крові спостерігався за його концентрації у воді 2500 мкг/дм³, що значно перевищує його вміст у природних водоймах [96].

Негативний вплив естрогенів на частоту серцевих скорочень спостерігали за різної концентрації у воді (0,1, 1, 10, 100 і 1000 нг/дм³), що встановлено в експериментах на ембріонах медаки [29]. Зареєстровано також короточасний вплив сублетальної концентрації (1 ppm) бісфенолу А на гематологічні показники та біохімічні зміни у мозамбікської тиляпії (*Oreochromis mossambicus* L.) [29]. Вплив цього ксенобіотику на морфологічний склад крові викликаний зменшенням кількості еритроцитів, лейкоцитів і гемоглобіну, що свідчить про розвиток анемії, спричиненої порушенням синтезу гему [29]. Іншою сполукою, яка може взаємодіяти з рецепторами естрогенів, є відомий мікотоксин – зеараленон [32].

Показано, що у личинок рибок даніо (*Danio rerio* L.), яких піддали впливу зеараленону у концентрації 0,1 мкг/дм³ виникали дефекти серцевого м'яза, пов'язані з порушенням експресії генів [33]. Експозиція коропів (*Cyprinus carpio* L.) у воді з різною концентрацією естрону (1 нг/л, 1 мкг/л та 1 мг/л) спричиняла цитогенотоксичний ефект на кров через вплив на апоптичні сигнальні шляхи [106, 142]. Цитогенотоксичний ефект проявлявся у збільшенні частоти мікроядер, TUNEL-позитивних клітин і активності каспази-3, причому найсильніший вплив спостерігався за найвищої концентрації естрону [106]. Негативний вплив естрогенів на кровотворні органи у більшій мірі проявляється для молодих або личинкових стадій риб. Важливо також додати, що повні механізми або шляхи, що призводять до виникнення порушень системи кровообігу або анатомічних дефектів її елементів у риб під впливом стероїдів, залишаються до кінця не з'ясованими [29, 106, 142].

Відомо, що метаболічна відповідь на дію статевих гормонів у кісткових риб реалізується через гормон-рецептний комплекс, провідна роль в утворенні якого належить білкам-рецепторам. Встановлено роль різних рецепторів у передачі гормональних сигналів [38, 107], а також ряд особливостей у їх будові [108]. Кісткові риби відрізняються від ссавців тим, що мають інший тип рецептора естрогенів (ER- γ) [108], функція якого тісно пов'язана з рецептором ER- β і дістала назву ER β 2. Встановлена подібність між рецепторами стероїдів ER- β і ER- γ є ймовірно специфічною для кісткових риб через вплив гормонів на реплікацію гена. Крім того кісткові риби відрізняються від ссавців тим, що мають дубльовані мембранні естрогенові рецептори *gpera* та *gperb*, які ймовірно відіграють важливу роль у нейроендокринному контролі розмноження [65, 112]. Ліганди ендокринних рецепторів зв'язують естрогени, тобто групу статевих гормонів самок, які беруть участь в ендокринній регуляції багатьох фізіологічних процесів і різноманітності поведінки риб. Однак, як було з'ясовано, деякі синтетичні хімічні сполуки діють в організмі подібно до естрогенів, зв'язуючись з рецепторами, що дає можливість встановити механізм їх дії [38, 107].

Стероїдним гормонам відводять особливе значення в регуляції метаболічних процесів у тканинах гідробіотів, зокрема і у кісткових риб [51]. Цей вплив обумовлений сумісною дією естрогенів і їх рецепторів на окремі ланки гомеостазу в організмі, зокрема глюконеогенез та енергетичний обмін [26, 33]. Порушення механізму регуляції метаболізму ендокринними руйнівниками шляхом інгібування реакції, яку каталізує сульфотрансфераза, викликає утворення неактивних форм естрогенів та підвищує рівень стероїдів у тканинах риб [74, 112]. Впливаючи на рецептори естрогенів, можна інгібувати активність Ca^{2+} -АТФази, що викликає мобілізацію іонів кальцію в клітинах, підвищує ризик апоптозу і сприяє виникненню ендокринних розладів у риб [74, 142]. Це було підтверджено дослідженнями впливу бензофенолу, який блокує рецептори естрогенів, змінюючи вміст кальцію та метаболізм глутатіону, зокрема активності глутатіонтрансaminaзи, глутатіонтрансмутази і глутатіонтрансдуктази [74]. Відомо, що глутатіон є важливим компонентом у механізмі детоксикації продуктів ПОЛ і, як було встановлено, метаболізму тренболону, синтетичного стероїдного гормону синтезованого на основі 19-нортестостерону (нандролону). У риб ендокринні руйнівники негативно впливають на перетворення глюкози та кількість енергії в клітині, змінюючи активність ключових ензимів, зокрема глюкокінази [21].

Природні та синтетичні естрогени, зв'язуючись з мембранними рецепторами клітин, здатні впливати на вміст ендогенного гормону 11-кетотестостерону [73], знижуючи його вироблення в інтерреналових клітинах нирок риб. Цей вплив може відбуватися внаслідок зменшення активності одного або кількох стероїдогенних ферментів, які перетворюють прогестерон у тестостерон, а останній у 11-кетотестостерон [85].

Білки-рецептори статевих гормонів, зокрема естрогену впливають на процес аутофагії в печінці, а також синтез основного білка-попередника яєчного жовтка вітелогеніну, який забезпечує поживні речовини ікри риб [50, 103, 133]. Встановлено, що синтез вітелогеніну в печінці риб залежить від рівня естрогену в організмі. У період нересту кісткових риб цей процес активується

і знижується в міжнерестовий період. На синтез вітелогеніну в печінці впливають стать, доза гормону і стадія відтворення риби [50]. Однак, не дивлячись на проведені дослідження, механізми, відповідальні за індукцію стероїдних рецепторів естрадіолом у печінці, залишаються до кінця не з'ясованими для більшості кісткових риби. Окремі результати досліджень вказують лише на значний вплив 17β -естрадіолу на стабілізацію мРНК стероїдних рецепторів [103, 131, 143].

У кісткових риби значна роль у метаболізмі ліпідів належить печінці, яка метаболізує гліцерол та жирні кислоти у тригліцериди, впливаючи на ріст і розвиток тіла та гонад. Регуляторна роль в обміні ліпідів належить стероїдним гормонам, а порушення їх синтезу негативно впливає на розвиток риби і їх продуктивність [103, 133, 150]. Встановлено, що обмін ліпідів у рибок даніо залежить від статі, причому накопичення жиру у самок відбувається значно інтенсивніше ніж у самців за рахунок тригліцеридів [133]. Показано, що стероїдний гормон естрон впливав на обмін ліпідів у самок інтенсивніше ніж у самців, що значно збільшувало накопичення ліпідів у тканинах. Введення естрону самцям викликало фемінізацію гонад і трансформацію ліпідного метаболізму в фенотип самок [133].

У кісткових риби метаболізм ліпідів тісно пов'язаний із активністю ензимів і транскрипцією генів, яка регулюється безпосередньо рецепторами естрогену та 17β -естрадіолом [89]. Про це свідчать дані щодо збільшення експресії ряду генів і білка аполіпопротеїну, асоційованого з ліпопротеїнами дуже низької щільності у печінці у відповідь на введення стероїду [58, 150]. Концентрація ліпопротеїнів дуже низької щільності, які синтезується в печінці і відіграють значну роль у транспорті тригліцеридів, значно збільшується в період нересту, як і активність ліпопротеїніліпази. Встановлено, що на активність ліпопротеїніліпази в печінці істотно впливає концентрація 17β -естрадіолу в тканинах різних видів риби [58, 75, 145]. Рівень тригліцеридів, олігогліцеридів, фосфатидилхоліну та фосфатидилінозитулу під час запліднення ікри залежить також від вмісту бісфенолу А. Механізм його дії на ліпідний обмін у риби

пов'язаний з активацією рецепторів естрогену, що викликає зміни в метаболізмі ліпідів. Відомо, що бісфенол А активує сигнальний шлях білка-1c, який зв'язує стероїдний регуляторний елемент (srebp-1c), через рецептор естрогенів. Він впливає також на процес метилювання ДНК і експресію мРНК апоферменту печінкового протеїну. Зі свого боку печінковий протеїн, який утворюється в різних тканинах риби, викликає секрецію тригліцеридів у кров і підвищує їх рівень у плазмі крові [151].

На метаболізм жиру також впливає експресія гену білка транспорту жирних кислот, який також діє як рецептор ліпопротеїдів низької щільності [26, 33]. Дослідження проведені на райдужній форелі показали, що 17β -естрадіол у високій концентрації не впливав на експресію жирнокислотної транслокази, але збільшував експресію одного з білків, що зв'язують жирні кислоти [52, 138]. У дослідженнях на нільській тілапії також було показано, що 17β -естрадіол у різній концентрації (10, 25 і 50 нг/дм³) індукував збільшення експресії гену ферментів, які каталізують синтез тригліцеридів у печінці [48]. Інгібування рецептора естрогену посилює експресію гену в гепатоцитах і нівелює ефекти впливу 17β -естрадіолу на процес синтезу тригліцеридів у печінці риби [48].

На синтез тригліцеридів у печінці риби впливає також інсуліноподібний фактор росту, концентрація якого, крім вмісту інсуліну, також залежить від рівня стероїдних гормонів. Встановлено вплив 17β -естрадіолу і нонілфенолу на експресію інсуліноподібного фактора росту 1 у печінці мозамбікської тілапії [46]. Причому за концентрації 1 мкг/дм³ 17β -естрадіолу і 10 мкг/дм³ нонілфенолу вони індукували 1b-зв'язуючі білки в печінці, тоді як нонілфенол за 100 мкг/дм³ підвищував рівень 2b-зв'язуючих білків. Інсуліноподібний фактор росту, зв'язуючись з рецептором Gh (Ghr), стимулює ріст м'язової тканини риби [46]. У кісткових риби цей фактор відіграє важливу роль у регуляції росту, як і в інших хребетних тварин. Однак, не дивлячись на одержані результати щодо механізму впливу стероїдних гормонів на метаболізм ліпідів у кісткових риби, значна кількість питань залишається не з'ясованою.

Джерелом ендокринних сполук, окрім води, можуть бути донні відкладення водою і за певних умов потрапляти в організм риб та впливати на транскрипцію генів, викликаючи ендокринні порушення [87, 99]. Дослідженнями на райдужній форелі (*Oncorhynchus mykiss* L.), яка була піддана впливу естрогенних сполук виділених із мулових відкладень, виявлено збільшення кількості транскриптів генів відповіді на естрогени і аномальну індукцію вітелогеніну в шкірному слизу [99].

Досліджено вплив 17 β -естрадіолу у концентрації 0,04, 0,4, 4,0 нМ, 17 β -етенілестрадіолу у концентрації 0,004, 0,04, 0,4 нМ і 4-нонілфенолу у концентрації 4,0, 40 і 400 нМ на зв'язування білка інсуліноподібного фактору росту у мальків атлантичного лосося (*Salmo salar* L.) [40]. Встановлено, що 17 β -естрадіол і 17 β -етенілестрадіол у різних концентраціях підвищували у мальків атлантичного лосося рівень мРНК Vtg, тоді як рівні інсулінового фактору росту 1 і 2, а також білки рецептора гормонів знижувались. Автори дійшли висновку, що екзогенні естрогени можуть модулювати ріст мальків атлантичного лосося і впливати на їх розвиток на ранніх стадіях [40, 131].

Досліджено сумісну дію температури води і стероїдів на організм кісткових риб [81]. Встановлено, що за комбінованого впливу температури води та 17 β -естрадіолу, 17 β -етенілестрадіолу і діетилстильбестролу на тиліпю вміст жиру в м'язах підвищувався. Це свідчить про важливу роль стероїдних гормонів у регуляції ліпідного обміну в м'язах риб [81]. Водночас дослідження впливу 17 β -естрадіолу, тестостерону та дигідротестостерону на розподіл поживних речовин, енергетичний баланс та експресію генів у тканинах райдужної форелі (*Oncorhynchus mycuys* L.) показали, що у самок спостерігався активний розвиток статевих залоз, знижувався відсоток філейної частини, але вміст жиру у внутрішніх органах не змінювався [52]. Зареєстровано значні зміни транскриптів генів у печінці риб внаслідок дії 17 β -естрадіолу, які відрізнялись за кількістю і стосувались механізмів впливу гормону росту, інсуліноподібного фактору росту, білків, що їх зв'язують, окремих генів, пов'язаних із транспортом ліпідів і окисленням жирних кислот. У м'язах ці зміни стосувались впливу

на міогенний ген і ген пов'язаний із катепсином-L. Одержані дані розкривають роль стероїдних гормонів у регуляції метаболізму ліпідів, особливо в період розвитку гонад на початку нерестового періоду у самок райдужної форелі [52].

Отже, узагальнюючи наведені дані, слід зазначити, що ендogenous стероїдні гормони контролюють в організмі риб основні процеси обміну вуглеводів, ліпідів, протеїнів, мінеральних речовин. Введення в організм синтетичних стероїдів може порушувати вказані метаболічні шляхи і механізми їх регуляції у кісткових риб [146].

Однак, незважаючи на наведені дані, актуальними залишаються також дослідження окремих ланок метаболізму в тканинах, залежних від ендogenous стероїдних гормонів, що дасть можливість поглибити сучасні уявлення щодо впливу синтетичних стероїдів не тільки на фізіологічні функції але і на окремі реакції гомеостазу в тканинах кісткових риб.

1.1.2. Активність ензимів у тканинах риб за дії стероїдних гормонів

Дія стероїдних гормонів на метаболізм у тканинах кісткових риб залежить від їх впливу на вміст ендogenous поліпептидних гормонів, а також на активність ензимів, що контролюють швидкість реакцій перетворення вуглеводів, ліпідів, амінокислот, макроергічних сполук, процесів ПОЛ та активність ензимів системи антиоксидантного захисту [22, 27, 94, 117, 127]. Анаболічні стероїди стимулюють синтез структурних і ферментних систем клітини, активують цитохромоксидазу, сукцинатдегідрогеназу, β -глюкоронідазу, а також синтез гормонів поліпептидної структури [94, 117]. Утворюючись в інтерреналових клітинах нирок риб, вони потрапляють в органи-мішені де зв'язуються з специфічними рецепторами ядра та мембран клітини, утворюючи гормон-рецепторні комплекси, які забезпечують передачу сигналу на внутріклітинні структури, включаючи процеси транскрипції РНК [117, 140].

Рецептори стероїдних гормонів представлені білками, а їх комплекси з гормонами стимулюють синтез специфічних регуляторів – вторинних месенджерів у цитоплазмі, які передають «сигнал» на відповідний ензим,

стимулюючи його активність, що змінює окремі ланки метаболізму в цитоплазмі клітини [26, 35, 48, 94]. Внутріклітинний посередник не тільки передає «сигнал» від гормону але й регулює швидкість ензимної реакції, або викликає експресію одного чи групи генів, що знаходяться в неактивному стані [48, 94]. Стероїдні гормони у кісткових риб, володіючи анаболічним ефектом, контролюють значну кількість ферментативних реакцій обміну вуглеводів, ліпідів, амінокислот, активність ензимів, окисно-відновні та енергетичні процеси в тканинах [78, 129]. Впливаючи на синтез пептидних гормонів, стероїдні гормони регулюють активність, кількість та властивості ензимів у тканинах [94, 129]. Вони контролюють біологічні ритми, диференціацію статі, нерест, ріст та розвиток личинок, стимулюють біосинтетичні процеси в тканинах кісткових риб, збільшуючи масу тіла [30, 40, 44, 48, 78, 81, 116]. З'ясовано, що важливу роль у регуляції гомеостазу в тканинах самок та самців кісткових риб відіграють не тільки естрогени але і естрогенні рецептори [83, 94, 112]. Досліджено їх вплив на внутріклітинні процеси у гідробіонтів, зокрема риб [85, 94, 117]. Відомо негеномний та геномний шляхи впливу естрогенів та їх рецепторів, розміщених на клітинних мембранах та в ядрі на метаболізм в клітині [144]. Про вплив стероїдів або їх аналогів на обмін речовин у тканинах свідчить велика кількість експериментів проведених на теплокровних тваринах та різних видах риб. Результати цих експериментів проаналізовано і узагальнено в ряді оглядових статей та монографій [72, 94, 116, 117, 124, 129]. Останнім часом значну увагу дослідників зосереджено на з'ясуванні ролі естрогенів та їх рецепторів у регуляції метаболізму в тканинах кісткових риб за дії різних стероїдів та їх синтетичних аналогів [44, 100, 115]. Показано, що введення до раціону 17α -метилтестостерону у концентрації від 60 до 120 мг/кг корму і використання його в годівлі мальків *Channa punctatus* і *Cirrhinus mrigala* позитивно впливало на їх продуктивність та інтенсивність росту [100]. Встановлено, що довжина тіла та вага мальків *Channa punctatus*, які отримували гормон у дозі 100 мг/кг, а *Cirrhinus mrigala* – у дозі 60 мг/кг були значно вищими, ніж за іншого вмісту 17β -метилтестостерону. Найвища питома швидкість росту мальків *C. punctatus*

zareєстрована за концентрації гормону 100 мг/кг корму, а *C. mrigala* – за 60 мг/кг. Однак досліджуваний гормон 17α -метилтестостерон у вказаних концентраціях не впливав на виживаність мальків досліджуваних видів риб [100].

Встановлено рістстимулюючий ефект екзогенного стероїду 17α -метилтестостерону, який також впливав на забарвлення тіла та розвиток гонад у *Opsariichthys bidens*, тоді як 17β -естрадіол проявляв значний гальмуючий ефект. Крім того 17α -метилтестостерон стимулював розвиток сім'яників у самців, блокував розвиток ооцитів і викликав масивний апоптоз у самок [44, 146].

Гормон 17β -естрадіол стимулював у самок розвиток яєчників і пригнічував розвиток сім'яників. Вказані зміни розвитку статевих органів у риб, як вказують автори, ймовірно пов'язані із впливом 17β -естрадіолу на експресію генів *igf-1: sup19a1a* у самок і *dmrt1* у самців [44]. Отже, доведено, що 17α -метилтестостерон і 17β -естрадіол відіграють важливу роль у зміні морфологічних статевих ознак у самок і самців [115].

У риб, як і у ссавців, спостерігається явище статевого диморфізму, яке пов'язане із статевими стероїдами, а також соматотропною і репродуктивною ендокринною системами. Це доведено дослідженнями впливу синтетичних стероїдів 17α -метилтестостерону і 17β -естрадіолу на прояв статевого диморфізму у *C. Semilaevis* [93]. На відміну від попередніх досліджень вказані стероїдні гормони проявляли інгібуючий вплив на показники росту риб різних статей *C. semilaevis*. Вказані зміни у риб автори пов'язують із експресією генів інсуліноподібного фактора росту 2, 24-дегідрохолестеринредуктази, лептину та рецептора естрогену 2 в печінці. Встановлено також зниження експресії інсуліноподібного фактора росту 1, тоді як експресія білка, асоційованого з рецептором тиреоїдних гормонів 3 (*thrap3*), в гонадах збільшувалась після застосування 17α -метилтестостерону і 17β -естрадіолу [93]. Одержані результати розкривають важливі аспекти впливу екзогенних естрогенів, що потрапляють у воду зі стічними водами комунальних закладів та тваринницьких підприємств, на фізіологічні функції у кісткових риб [47, 109, 110, 123]. Останнім часом дослідники стурбовані наявністю у стічних водах та питній воді ксенобіотиків

антропогенного походження, здатних впливати на ендокринну систему тварин та людей [34, 87, 109, 116], викликати ендокринні порушення, змінювати видовий склад та ріст риб природних водойм [52, 152], забруднювати ґрунти стероїдними гормонами [152], впливати на навколишнє середовище і здоров'я тварин [39, 145].

В останні роки значна кількість досліджень також присвячена з'ясуванню механізму впливу 17β -етенілестрадіолу, основного компонента протизапліднюючих засобів, який знаходять у воді в значних кількостях, на серцеву діяльність, ембріональний розвиток, диференціацію статі у риб, а також процеси транскрипції [30, 92, 119]. Стан ендокринної системи у риб значною мірою залежить від синтетичних естрогенів, зокрема 17α -етинілестрадіолу, про що свідчать результати досліджень його впливу на репродуктивну функцію, ріст та імунітет [30]. Встановлено, що згодовування морським лящам 17α -етинілестрадіолу викликало гіпертрофію і гіперплазії білих волокон м'язів, впливало на експресію генів *mafbx*, відповідальних за катаболічні сигнали та *mstn2* – регулятора міогенезу [30]. Згодовування триплоїдним самкам райдужної форелі 17β -естрадіолу, тестостерону або дигідротестостерону у дозі 30 мг/кг протягом 30 днів впливало на ріст, розподіл поживних речовин і експресію генів, що контролюють метаболізм поживних речовин [52]. Досліджувані стероїди не впливали на розвиток статевих залоз у триплоїдних самок, тоді як їх вага у диплоїдних самок зросла з 3,7 % до 5,5 % маси тіла протягом усього періоду. Триплоїдні риби, яким згодовували дигідротестостерон, мали більший темп росту ніж контрольні. Добавка 17β -естрадіолу дещо зменшувала у триплоїдних самок ріст філе, що спричинило нижчий вихід, порівнюючи з іншими дослідними групами. Споживання стероїдів навпаки не вплинуло на збільшення жиру у внутрішніх органах риб. Дослідження транскриптів генів, пов'язаних з шляхами впливу стероїдів на вищевказані процеси, показали, що вони відрізнялися за чисельністю, порівнюючи з контролем. У печінці ці механізми включали вісь гормон росту/інсуліноподібний фактор росту (IGF) (*igf1*, *igf2*), білки, що зв'язують інсуліноподібний фактор росту (*igfbp1b1*, *igfbp2b1*, *igfbp5b1*, *igfbp6b1*) і гени,

пов'язані зі зв'язуванням і транспортом ліпідів (*fabp3*, *fabp4*, *lpl*, *cd36*), окисленням жирних кислот (*cpt1a*) і фактором транскрипції (*pparg*). Встановлено зниження експресії міогенного гена (*fst*, *myog*) і гена, пов'язаного з протеолізом, катепсином-L у м'язах, що свідчить про зниження здатності до росту м'язів, індуковане 17 β -естрадіолом [52]. Одержані результати свідчать про підвищення передачі сигналів 17 β -естрадіолу у статевозрілих самок райдужної форелі, що змінює метаболічні шляхи в печінці, особливо ті, що пов'язані з передачею сигналів інсуліноподібного фактора росту і метаболізмом ліпідів. Ймовірно мобілізація ліпідів у внутрішніх органах риб дослідних груп опосередковується не стільки 17 β -естрадіолом, а більшою потребою в енергії, пов'язаною з розвитком гонад [89]. Наведені результати поглиблюють розуміння регуляторної ролі стероїдів у метаболізмі поживних речовин, щоб задовольнити високі енергетичні потреби, пов'язані з розвитком статевих залоз під час статевого дозрівання [31, 52].

1.2. Характеристика синтетичних стероїдів та їх вплив на метаболічні процеси в тканинах риб

1.2.1. Обмін речовин у тканинах риб за дії синтетичних стероїдів

Застосування синтетичних стероїдів для лікування різних захворювань тварин та людей як реабілітаційних засобів та анаболіків, а до недавнього часу як стимуляторів росту тварин, створило не тільки значну екологічну але й соціальну проблему [34, 64, 68, 87, 149]. Це призвело до розповсюдження і накопичення стероїдних гормонів, зокрема синтетичних аналогів естрогенів та андрогенів у природних водоймах, що викликало значний науковий інтерес до пошуку способів вирішення проблеми їх негативного впливу на гідробіонтів [34, 87, 91, 149].

Проведеними дослідженнями виявлено чотири вільних естрогени, чотири кон'юговані естрогени і бісфенол А у стічних водах різних видів тваринницьких підприємств [149]. Джерелом цих стероїдів у воді є організм тварин. Щоденна

загальна екскреція естрогенів (вільних та кон'югованих) у фекаліях корови становить 145,23–179,27 мкг/день, а в сечі свині – 42,56–219,25 мкг/день. Естрогенові кон'югати складають 14,6–48,8 % від загальної екскреції естрогенів у коров'ячих фекаліях та понад 98 % у сечі свиней. Загальна кількість естрогенів у курки становила 0,66–12,78 мкг/добу, які виділяються з послідом, з яких 34,2–100 % – кон'юговані естрогени [149]. Деяка частина естрогенів видалялась унаслідок анаеробних процесів та компостування гною і складала 14,7–21,8 %, відповідно менше 70,1 %. Серед виявлених естрогенів основну кількість становлять гормони естрон, естрадіол, 17 β -естрадіол, естрон-3S і естрадіол-3S. Всі вони виявлялись в обробленому гної в концентраціях до 2695 \pm 181 нг/л (анаеробний дигестат) і до 80,8 \pm 6,0 нг/г у компості. Біфенол А був знайдений у зразках екскрементів і компосту в однаковому вмісті (nd–25 нг/г). Близько 60–70 % від його загальної кількості було видалено із стічних водоочисних споруд [149]. Природні естрогени, такі як естрон, 17 α -естрадіол, 17 β -естрадіол і естріол, можуть потрапляти у природні водойми через скиди з очисних споруд, а в ґрунт через гній худоби і послід птиці [68, 91]. Хоча естрогени виявляються лише на рівнях нг/л у водному середовищі, вони є основними сполуками, відповідальними за фемінізацію самців риби [28, 91]. Отже, важливим джерелом природних естрогенів у навколишньому середовищі є тварини, що виділяють різні ендогенні стероїди, кількість яких залежить від виду тварин, статі, віку, циркадного циклу та репродуктивного стану [47, 66, 88, 149].

Основними стероїдними гормонами та їх синтетичними аналогами, які виявлено у воді природних водойм є естрогени – естрон, 17 β -естрадіол, 17 β -етенілестрадіол, метилестрадіол, а також андрогени – тестостерон і його синтетичні аналоги 19-нортестостерон (нандролон), стеноболон, тренболон та ряд інших сполук [47, 66, 149]. Вказані стероїдні гормони знаходять у природних водоймах у різній концентрації, яка в середньому становить від 1,0 до 45,0 мкг/дм³ [14]. Не дивлячись на низьку концентрацію у воді, синтетичні стероїди впливають на фізіологічні функції та метаболізм у тканинах риби [6, 7, 9]. На вміст ендогенних стероїдних гормонів у тканинах риби впливають також

фітоестрогени, що містяться в рослинах і надходять в організм з кормами [10, 11, 70, 141]. Крім того вони володіють і естрогенною активністю в організмі [141].

З'ясовано вплив синтетичних анаболічних стероїдів, зокрема нандролону, на корошових риб [6, 8, 9]. Показано, що його дія на риб є багатогранною, залежить від концентрації у воді і пов'язана із зміною морфологічних показників крові та біохімічних процесів у тканинах [6, 9]. Кісткові риби, зокрема корошові, здатні адаптуватись до низької концентрації цього ксенобіотика у воді, змінюючи, як показали дослідження, вміст метаболітів та активність ферментів обміну глюкози, тригліцеридів, переамінування амінокислот, гідролізу фосфорорганічних сполук і трансмембранних процесів у тканинах [13, 15]. Зокрема досліджено вплив синтетичного стероїду нандролону, який є похідним тестостерону, на гліколіз, ліпогенез, переамінування амінокислот та гідроліз фосфорорганічних сполук [9, 15].

Вплив синтетичних стероїдів, до яких відносять і похідні тестостерону, зокрема 19-нортестостерон (нандролон), на фізіологічні функції в організмі та основні метаболічні процеси в тканинах детально досліджено на лабораторних тваринах – мишах, щурах і кролях [147]. Відомо, що вказаний синтетичний стероїд володіє вираженим анаболічним і незначним статевим ефектом, стимулює біосинтез протеїнів у м'язовій тканині і структурних компонентах клітин. Він позитивно впливає на азотистий баланс в організмі і володіє у комплексі з залізом антианемічною дією. Нандролон гальмує синтез гонадотропінів і ендогенного тестостерону, порушує синтез вітамін-К-залежних факторів згортання крові в печінці, змінює ліпідний профіль плазми крові, посилює реабсорбцію води і натрію нирками. У пацієнтів нандролон стимулює еритропоез, збільшуючи кількість еритроцитів і концентрацію гемоглобіну в крові [147]. Встановлено механізм андрогенної дії нандролону, який включає активацію низки ензимів енергетичного обміну, синтезу ДНК і РНК, окиснювального фосфорилування та накопичення АТФ і креатинфосфату в м'язах [147]. Метаболізується нандролон у печінці за участю ферментів перетворення тестостерону, шляхом

гідроксилювання, що веде до утворення низки кон'югатів 19-норандростерону, 19-норетіохоланолону і 19-норепіандростерону, які видаляються з сечею [153].

Важливим, з точки зору впливу нандролону, на фізіологічні процеси в організмі кісткових риб є дослідження морфологічного складу крові. Виявлено, що нандролон за концентрації у воді 100 мкг/дм^3 збільшував кількість еритроцитів, концентрацію гемоглобіну і ШОЕ, знижував кількість еозинофілів і сегментоядерних нейтрофілів і не впливав на кількість лейкоцитів, лімфоцитів і моноцитів у крові риб [6]. За більш високої концентрації синтетичного стероїду у воді його вплив на кровотворні органи риб зростає, що підтверджено збільшенням вмісту гемоглобіну, кількості моноцитів і ШОЕ, зменшенням кількості лейкоцитів, еозинофілів і сегментоядерних нейтрофілів [6]. Встановлено негативний вплив високої концентрації нандролону у воді на кровотворні органи риб, про що свідчать суттєві зміни морфологічного складу крові [6]. Однак за низької концентрації у воді (50 мкг/дм^3) нандролон не впливав на концентрацію гемоглобіну, кількість еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів та лейкоцитарну формулу крові коропів, що вказує на здатність кісткових риб адаптуватись до синтетичних стероїдів у воді за їх нетривалого впливу [9]. На зміну гематологічних показників у риб за дії синтетичних стероїдів вказують результати досліджень й інших авторів [17, 18]. Зміна морфологічних показників крові коропів за дії нандролону, ймовірно, пов'язані із його впливом на внутрішньоклітинні процеси в тканинах і насамперед у кровотворних органах [20]. У невеликих дозах нандролон не викликає суттєвих змін морфологічного складу крові риб, а у високих негативно впливає на кровотворні органи риб. Одержані дані можуть також бути одним із діагностичних тестів під час встановлення токсичного впливу гормонів на організм кісткових риб. Являючись анаболічним стероїдом який входить до групи прогестеронів, нандролон змінює метаболізм у тканинах, який залежить від насичення крові риб киснем [21].

Нандролон підвищував загальний вміст протеїну, а також впливав на білковий спектр плазми крові коропа (*Cyprinus carpio* L.) [8, 12]. Причому чим вищою була концентрація вказаного ксенобіотика у воді, тим суттєвіші зміни

фракційного складу білків плазми крові спостерігались. Збільшення вмісту протеїну в плазмі крові риб дослідних груп, як стверджують автори, є наслідком стимуляції нандролоном біосинтезу білка в тканинах, який проявляє у риб, як і в теплокровних тварин, анаболічний ефект [8]. Витримування коропів у воді з концентрацією нандролону 100 мкг/м^3 підвищувало вміст білка в плазмі крові риб у середньому в 1,5 рази, а рівень холестерину, порівнюючи з контролем, на 27,5 % і більше [15]. За низького рівня гормону у воді в плазмі крові риб спостерігались лише зміни окремих протеїнів з низькою та середньою молекулярною масою. За вищої концентрації (500 мкг/дм^3) синтетичного стероїду у воді в плазмі крові риб збільшується рівень протеїнів з низькою (25–35 кДа), середньою (70 і 50 кДа) і високою молекулярною масою (260–450 кДа) [12]. Зроблено висновок, що нандролон за низької концентрації у воді стимулює синтез білків у гепатопанкреасі, що суттєво впливає не тільки на вміст білків у плазмі крові, але й змінює їх електрофоретичну рухливість. Виявлені зміни фракційного складу білків плазми крові, за висновком автора, є наслідком активації нандролоном активності ензимів синтезу протеїнів та впливом на електрофоретичну рухливість окремих білків [12].

Андрогенний ефект синтетичних стероїдів у тканинах кісткових риб залежить від концентрації у воді і направлений на внутрішньоклітинний метаболізм у тканинах [8, 9, 16]. Оскільки дія синтетичних гормонів в організмі тварин тісно пов'язана із впливом на вміст ендогенних стероїдів у тканинах, було досліджено окремі ланки обміну речовин у риб за дії нандролону. Основна увага дослідників була зосереджена на контролі за вмістом окремих метаболітів обміну вуглеводів, ліпідів та білків, що є основними критеріями оцінки впливу гормональних сполук на метаболізм в організмі гідробіонтів. Реакція риб на перебування у воді за додавання нандролону характеризувалась підвищенням вмісту загального білка в плазмі крові риб у середньому у 1,5 рази, тоді як концентрація глюкози та холестерину, важливого попередника ендогенних стероїдів в організмі, не змінювалась [12]. Його рівень у плазмі крові риб залежав від концентрації стероїду у воді. З'ясовуючи роль стероїдного гормону

нандролону на обмін речовин у тканинах риби, було встановлено, що він впливає на концентрацію глюкози, тригліцеридів, креатиніну, холестеролу, неорганічного фосфору та активність ензимів переамінування аланіну і аспарагінової кислоти [9, 21]. Причому за низької концентрації і нетривалого впливу нандролон підвищував вміст загального білка та альбумінів у плазмі крові і не впливав на концентрацію глюкози, тригліцеридів, креатиніну і кальцію в плазмі крові, одночасно знижуючи вміст неорганічного фосфору і заліза. За високої концентрації нандролону у воді, навіть за нетривалої дії, у плазмі крові коропів знижувався вміст глюкози, неорганічного фосфору і заліза, а тригліцеридів і креатиніну не змінювався [9]. Встановлено значний вплив синтетичних стероїдів на вміст глюкози та інших метаболітів обміну ліпідів, неорганічного фосфору, креатиніну та заліза в гепатопанкреасі риби, концентрація яких залежала від його вмісту у воді. Виявлено значне підвищення вмісту глюкози в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риби, які знаходились впродовж 24 годин у воді з різною концентрацією 19-нортестостерону. Причому вміст глюкози в гепатопанкреасі риби збільшувався із підвищенням синтетичного стероїду у воді [8]. Вказані зміни викликані, стимулюючим впливом 19-нортестостерону на біосинтез білка, що потребує додаткових джерел енергії за рахунок розщеплення глікогену та синтезу глюкози із глікогенних амінокислот [94].

Кісткові риби потребу в енергетичних ресурсах задовольняють не тільки за рахунок глюкози, але і тригліцеридів, які є джерелом енергетичних субстратів – гліцерину та жирних кислот [94]. Показано підвищення вмісту тригліцеридів у гепатопанкреасі риби за впливу синтетичних стероїдів [8]. Крім того нандролон посилював реакції перетворення макроергічних сполук у тканинах, зокрема креатинфосфату в м'язах риби, внаслідок підвищення активності креатинфосфокінази і вмісту креатиніну в гепатопанкреасі. Встановлено зростання у 2,08 рази концентрації креатиніну в гепатопанкреасі риби за впливу нандролону, який утворюється внаслідок розщеплення креатинфосфату. Ці зміни підвищували концентрацію неорганічного фосфору в гепатопанкреасі риби, не дивлячись на те, що збільшення вмісту нандролону у воді до 200 мкг/дм³

не впливало на подальше зростання значення цього показника [8]. Синтетичний стероїд нандролон не впливав на вміст кальцію, але підвищував концентрацію заліза в гепатопанкреасі риби, важливого компонента низки ензимів енергетичного обміну в тканинах риби [8].

Отже, на підставі проведених досліджень можна зробити висновок про стимуляцію синтетичними стероїдами енергетичного обміну та біосинтетичних процесів у тканинах кісткових риби, які залежать від його концентрації у воді. Зроблений висновок узгоджується з результатами досліджень інших авторів, що вивчали вплив високих доз нандролону у воді на перебіг основних метаболічних процесів у тканинах [76]. За концентрації у воді 100 мкг/дм³ нандролон підвищував у плазмі крові риби загальний вміст протеїнів, холестеролу, сечовини, аспартатамінотрансферазну і лужнофосфатазну активності, знижував вміст глюкози і аланінамінотрансферазну активність. У гепатопанкреасі риби він стимулював глюконеогенез і синтез протеїнів, гальмував реакції уреогенезу, що підтверджено підвищенням вмісту глюкози, загального білка, зниженням рівня сечовини в цьому органі риби [76]. Крім того в гепатопанкреасі риби спостерігали активацію α -амілази і гальмування лужнофосфатазної та аланінамінотрансферазної активностей [76].

У ряді експериментів з'ясовано сумарний вплив стероїдів та інших ксенобіотиків, які містяться у стічних водах тваринницьких підприємств, на гематологічні показники та метаболічні процеси в тканинах риби. Одержані результати узгоджуються з дослідженнями, в яких показано вплив нандролону стічних вод, що містять й інші ендogenousні стероїди на метаболічні процеси в тканинах риби [7, 12, 21]. У карпових дія різних ксенобіотиків води характеризувалась зниженням концентрації гемоглобіну, кількості еритроцитів, тромбоцитів і моноцитів, підвищенням сегментоядерних нейтрофілів та величини ШОЕ в крові. Інші показники морфологічного складу крові риби не змінювались. У риби під впливом комплексу ксенобіотиків антропогенного походження, а саме синтетичних стероїдів, антибактерійних препаратів змінюється концентрація глюкози та вміст загального білка, а також активності

лактатдегідрогенази і креатинфосфокінази в плазмі крові і гепатопанкреасі. Однак за вмістом тригліцеридів, холестеролу, сечовини, креатиніну, кальцію, неорганічного фосфору, активністю аланінамінотрансферази і аспартатамінотрансферази у плазмі крові, а також за рівнем загального білка, глюкози, креатиніну, сечовини, кальцію, неорганічного фосфору і активністю лактатдегідрогенази, аланін- і аспартатамінотрансферази у гепатопанкреасі риб відмінностей не виявлено. Встановлені зміни концентрації гемоглобіну та кількості еритроцитів і тромбоцитів, а також окремих показників метаболізму у плазмі крові та гепатопанкреасі коропів, а саме: концентрації глюкози і вмісту білка, активності лактатдегідрогенази і креатинкінази, автори рекомендують використовувати як додаткові критерії під час оцінки впливу ксенобіотиків води на риб [7].

Узагальнюючи наведені результати досліджень з впливу стероїдів на метаболічні процеси в кісткових риб слід зазначити, що їх дія пов'язана із активацією процесів глюконеогенезу, гліколізу, аеробних процесів і ліпогенезу в органах і тканинах. Однак особливості впливу синтетичних стероїдів на вищевказані процеси в тканинах риб за різної концентрації у воді до кінця не з'ясовані.

1.2.2. Вплив синтетичних стероїдних гормонів на активність ензимів та ПОЛ в тканинах риб

Одним із шляхів впливу стероїдних гормонів на метаболізм у тканинах риб є зміна активності ряду ензимів, що контролюють перебіг реакцій обміну вуглеводів, ліпідів, амінокислот, окремих макро- та мікроелементів, синтез поліпептидних гормонів [13, 21]. Значну роль у зміні активності ензимів у тканинах риб відводять синтетичним стероїдам, яких все частіше виявляють у природних водоймах як ендокринні руйнівники [14, 21, 64, 87]. Встановлено вплив нандролону на α -амілазу в плазмі крові риб, активність якої залежала від концентрації ксенобіотика у воді. Це свідчить про зміну функціонального стану

гепатопанкреаса під дією нандролону, що впливає на інтенсивність гідролітичних процесів у кишечнику риб [13].

Метаболізм амінокислот у гепатопанкреасі риб тісно пов'язаний з процесами трансамінування та дезамінування, зокрема використання аланіну і аспарагінової кислоти в глюконеогенезі. Амінокислоти, перетворюючись у кетокислоти, беруть участь у синтезі глюкози, гліцерину та жирних кислот [119]. Крім того ряд кетокислот є джерелом енергії в тканинах риб [11]. Синтетичний стероїд нандролон у різних концентраціях підвищував у коропів активність ряду ключових ферментів, що контролюють низку метаболічних процесів у тканинах, зокрема реакції трансамінування, гідролізу фосфорорганічних сполук, креатинфосфату і трансмембранного процесів. За дії нандролону в плазмі крові риб зростає активність лужної фосфатази, яка є регулятором фосфорно-кальцієвого обміну, а також інтенсивності процесів дефосфорилування в клітинах. Вказаний ензим широко розповсюджений у різних тканинах риб, впливає на проникливість клітинних мембран, ріст та диференціацію клітин, стероїдогенез, бере участь у синтезі білків, фосфоліпідів та глікогену [119]. Зміну активності та динаміки лужної фосфатази в тканинах риб використовують як надійний критерій забруднення водних об'єктів ксенобіотиками та хімічного стресу [7, 76]. Наведені вище результати досліджень щодо впливу нандролону на активність лужної фосфатази в плазмі крові підтверджено результатами досліджень на коропах дворічного віку [76]. На залежність активності інших ензимів у тканинах риб у відповідь на дію синтетичних стероїдів вказують дослідження одержані іншими авторами [13, 21]. Встановлено збішення активності лужної фосфатази, креатинфосфокінази, аланін- і аспартатамінотрансферази в гепатопанкреасі та плазмі крові риб за дії синтетичного стероїду нандролону. Враховуючи роль кожного із наведених ензимів у реакціях гідролізу фосфорорганічних сполук, переамінуванні амінокислот, розщепленні креатинфосфату, вважають, що синтетичні стероїди викликають значні зміни інтенсивності вказаних процесів у тканинах риб [76].

Виявлено вплив нандролону на активність гамаглутамілтрансферази в плазмі крові, що контролює перебіг трансмембранних процесів в епітеліоцитах кишечника, а також впливає на вміст різних форм глутатіону в тканинах. Зміна активності вказаного фермента в плазмі крові свідчить про вплив синтетичних стероїдів на трансмембранні процеси в кишечнику риб, відновлення та окислення глутатіону в тканинах [13].

Важлива роль у механізмі адаптації риб до дії синтетичних стероїдів належить ензимам системи антиоксидатного захисту, яка представлена в гепатопанкресі риб низкою цитохромів, а також – глутатіонтрансферазою, СОД, пероксидазою і каталазою крові [16]. Їх активність у тканинах риб збільшувалась у відповідь на підвищення концентрації продуктів перекисного окиснення ліпідів, що може бути наслідком впливу синтетичних стероїдів [21]. Встановлено зростання активності СОД та загальної антиоксидантної активності сироватки крові, печінки та нирок не дивлячись на зниження концентрації ТБК-активних продуктів у тканинах за дії синтетичних стероїдів [16]. За незначної концентрації у воді і короткочасового впливу нандролон стимулював реакції утворення МДА і дієнових кон'югатів, що викликало зростання каталазної і СОД активності в гепатопанкреасі [21]. Із збільшенням концентрації вказаного синтетичного стероїду у воді його вплив на процеси ПОЛ і активність СОД в гепатопанкреасі посилювався, тоді як у плазмі крові вказані зміни не спостерігались. У відповідь на активацію нандролоном реакцій ПОЛ в гепатопанкреасі риб підвищувалась активність інших ензимів системи антиоксидантного захисту [114].

Важлива роль у знешкодженні вторинних продуктів пероксидації належить глутатіонтрансферазі, яка каталізує реакцію відновлення гідроперекисів ліпідів, гальмує процес пероксидації і утворення вторинних метаболітів [16]. На підставі одержаних результатів авторами зроблено висновок про те, що синтетичні стероїди у риб здатні впливати на стан антиоксидантної системи, змінюючи активність ензимів антиоксидантного захисту [16]. Цей процес залежить від здатності гормону зв'язуватись з рецептором, що передбачає утворення гормон-рецепторного комплексу. Отже, стероїдні гормони регулюють вміст і активність

внутрішньоклітинних месенджерів, що впливають на утворення та активність ензимів системи антиоксидантного захисту [16, 118]. З'ясовано механізм дії естрогенів на активність ензимів, який включає взаємодію гормону з відповідними рецепторами в цитоплазмі клітини, утворення гормон-рецепторного комплексу, перенесення його до ядра, активацію промоторів генів, запуск процесу транскрипції [103, 112, 114]. Відомо про роль ядерних і мембранних рецепторів естрогену у передачі гормонального сигналу на відповідний ген чи групу генів [83, 85].

Синтетичний стероїд нандролон, внесений у воду збільшував активність ряду ключових ензимів обміну глюкози в гепатопанкреасі риб, зокрема цитоплазматичної ЛДГ і Гл-6-Фази, а також мітохондріальної ПДГ і Гл-6-ФДГ [21]. Оскільки вказані ензими каталізують окремі реакції гліколізу, циклу трикарбонових кислот та пентозофосфатного шляху за участю нікотинамідних коферментів НАД⁺ і НАДФ⁺, зміна їх активності під впливом синтетичних стероїдів свідчить про зміну інтенсивності окисно-відновних процесів у гепатопанкреасі риб [21].

Отже, на основі наведених результатів можна зробити висновок про вплив синтетичних стероїдів на процес ПОЛ і активність ензимів, що каталізують реакції гідролізу, трансмембранного переносу метаболітів, окисно-відновні процеси в тканинах кісткових риб, інтенсивність яких залежить від концентрації гормонів у воді та терміну експозиції риб. Однак, що стосується механізму впливу синтетичних стероїдів на активність ензимів у тканинах кісткових риб, то більшість реакцій залишається до кінця не з'ясованою, не дивлячись на те, що детально досліджено вплив стероїдів та їх рецепторів на окремі елементи процесу перетворення ліпідів, вуглеводів і амінокислот, експресію генів, які контролюють синтез окремих ензимів у тканинах різних видів кісткових риб.

Заклучення з огляду літератури

На основі наведених даних слід зробити узагальнення та висновки, а також вказати на перспективи подальших досліджень щодо впливу екзогенних стероїдів

на організм кісткових риб. Стероїдні гормони у риб є важливими регуляторами фізіологічних функцій в організмі та метаболічних процесів у тканинах. Їх вплив на метаболізм у тканинах здійснюється шляхом взаємодії з рецепторами клітин органів – мішеней, через утворення гормон-рецепторного комплексу, який передає гормональний сигнал на внутрішньоклітинні месенджери – стимулятори активності ензимів та процесу транскрипції нуклеїнових кислот в ядрі клітини. Механізм дії стероїдних гормонів добре вивчений на теплокровних тваринах, що ж до кісткових риб то не дивлячись на багаточисельні дослідження він потребує подальшої роботи. Особливо це стосується екзогенних стероїдних гормонів, які становлять значну проблему для гідробіонтів, зокрема риб, потрапляючи у водні об'єкти. Встановлено вплив ендогенних і синтетичних стероїдів на окремі ланки метаболізму вуглеводів, ліпідів, активність ензимів у тканинах, синтез статевих гормонів в інтерреналових клітинах нирок риб. З'ясовано і окремі деталі перетворення екзогенних стероїдів в організмі кісткових риб і вплив на цей процес різних ксенобіотиків води. Що ж стосується впливу широковідомого синтетичного стероїду 19-нортестостерону на активність ензимів, обмін вуглеводів, ліпідів, процес перекисного окиснення ліпідів, систему антиоксидантного захисту і особливо гормональний стан в організмі кісткових риб, то ряд питань залишились поза увагою дослідників. Одержані результати дадуть можливість поглибити розуміння механізму впливу синтетичних стероїдів на гомеостаз в організмі кісткових риб.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Схема дослідів та умови їх проведення

Дослідження за темою дисертації виконано в науковій лабораторії кафедри ветеринарної гігієни імені професора А. К. Скороходька та в міжкафедральній лабораторії факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України.

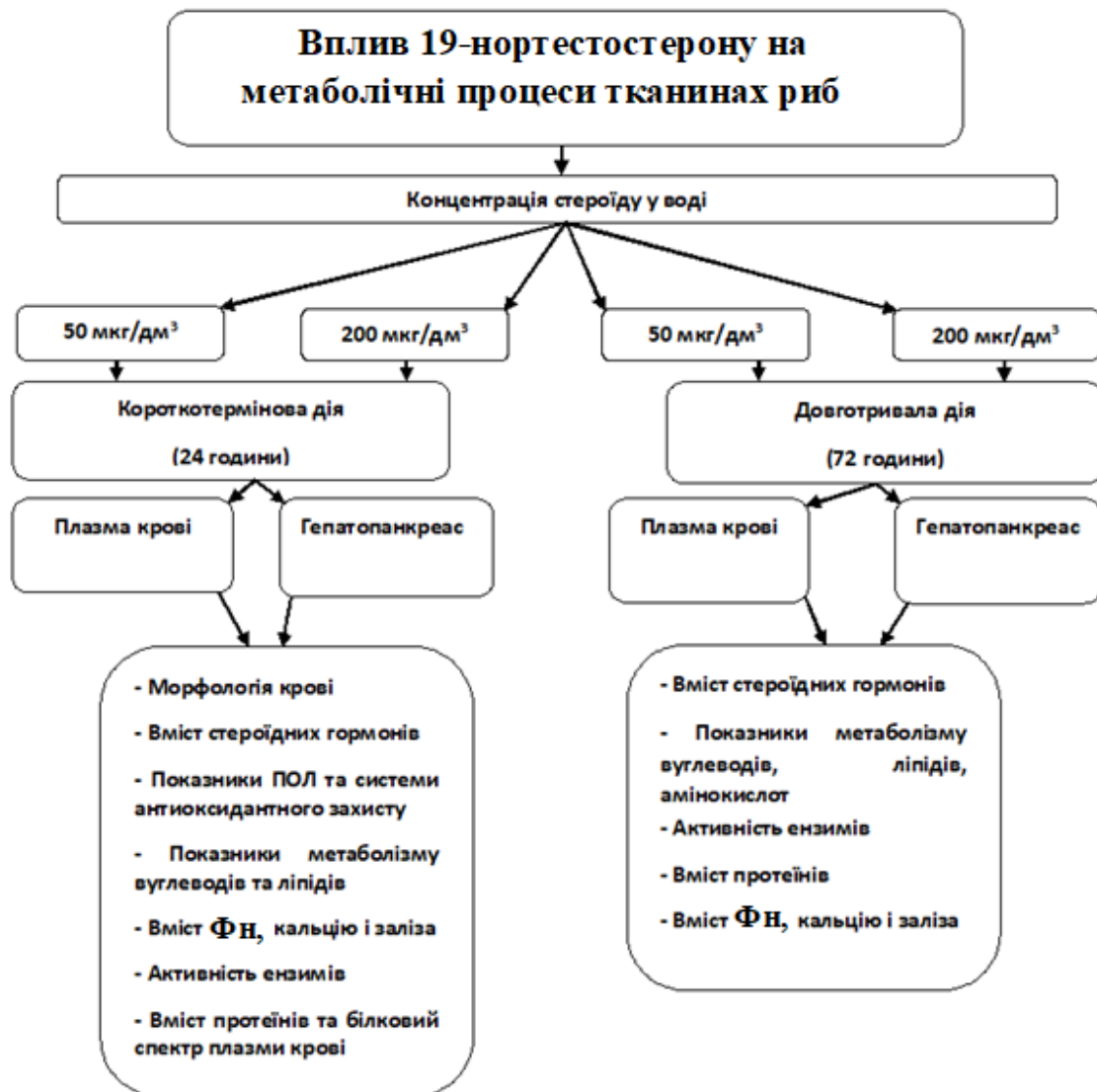


Рис. 2.1. Загальна схема досліджень

Поставлена в дисертації мета досягалась, а заплановані завдання вирішувались шляхом проведення чотирьох наукових експериментів, в яких досліджували вплив синтетичного анаболічного стероїдного гормону 19-нортестостерону (нандролону) у воді за його короткотермінової та довготривалої дії на морфологічний склад крові, активність ензимів обміну вуглеводів, ліпідів, окремих елементів мінерального обміну, показники перекисного окиснення ліпідів, вміст стероїдних гормонів у тканинах та фракційний склад білків плазми крові коропа лускатого (*Cyprinus carpio* L.). Всього для проведення експериментів було використано 75 коропів дворічного віку, середньою живою масою 680–820 г, вирощених у рибному господарстві філії «Антонов-Агро» ДП «Антонов», с. Круглик, Київської області. Умови проведення досліджень відповідали вимогам Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів чи інших наукових цілей (1986 р.), а також Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 р. 3447-IV у редакції від 04.08.2017 р.

Метою першого наукового експерименту було дослідити стан внутрішніх органів, морфологічний склад крові та показники обміну вуглеводів, ліпідів та окремих мінеральних речовин у плазмі крові риб за різної концентрації синтетичного анаболічного стероїду 19-нортестостерону (нандролону) у воді за короткотермінової дії. Експеримент проведено у вересні 2022 року. Коропів для досліду у кількості 6 екземплярів виловлювали із ставка, доставляли в лабораторію і витримували 60 хв у акваріумі з відстояною водопровідною водою. Риб поміщали по 2 екземпляри в три різні акваріуми об'ємом 40 м³ кожний. У воду першого акваріума попередньо вносили синтетичний анаболічний стероїд 19-нортестостерон (нандролон) у концентрації 50 мкг/м³ (перша дослідна група). Риб другої дослідної групи утримували у другому акваріумі, з концентрацією 19-нортестостерону у воді 200 мкг/м³. Коропів контрольної групи утримували в третьому акваріумі, без синтетичного анаболічного стероїду у воді. Було проведено три серії досліджень. Під час експерименту риб контрольної і дослідних груп не годували, а у воді акваріумів підтримували

оптимальну температуру (18–20° C), вміст кисню (6,2–7,0 мг/дм³) та рН (7,82). Впродовж експерименту, який тривав 24 години у риб контролювали кількість дихальних рухів після внесення гормону, а також через 0,5, 1, 3, 12 і 24 години з початку експерименту. У кінці досліду у риб визначали проміри тіла та живу вагу, стан зовнішнього покриву та плавців. Після цього у риб відбирали кров пункцією серця з допомогою ін'єкційної голки у пробірки з антикоагулянтом (гепарин). У відібраних зразках визначали морфологічний склад крові. Одержували плазму крові в якій досліджували показники обміну вуглеводів, ліпідів, мінеральних речовин, активність низки ензимів.

Метою другого наукового експерименту було дослідити активність ензимів обміну вуглеводів, окремих амінокислот, ліпідів, вміст окремих мінеральних речовин в гепатопанкреасі риб за різної концентрації синтетичного стероїду 19-нортестостерону (нандролону) у воді за короткотривалої дії. Дослід проведено у жовтні 2022 року на 18 коропах, яких після вилову із ставка витримували 60 хв у відстояній водопровідній воді, після чого зважували та ділили на три групи: контрольну, першу і другу дослідну по 6 екземплярів у кожній. Контрольну групу риб утримували в акваріумі об'ємом 40 дм³ у відстояній водопровідній воді. Риб першої дослідної групи утримували у другому акваріумі, попередньо додаючи у воду синтетичний анаболічний стероїд 19-нортестостерон, доводячи його концентрацію до 50 мкг/м³. Концентрація 19-нортестостерону у воді для риб другої дослідної групи, що знаходились у третьому акваріумі, становила 200 мкг/м³. Умови утримання риб у другому експерименті були аналогічними як і у першому досліді. Через 24 години експерименту риб зважували, використовуючи терези Axis BDM-30 та визначали проміри тіла та оцінювали стан покривів тіла, колір зябрових пелюсток та плавців. Після чого коропів забивали, дотримуючись встановлених вимог. У риб видаляли внутрішні органи, відділяли селезінку та гепатопанкреас, підтримуючи відповідний температурний режим (0–4° C). Маса селезінки і гепатопанкреаса визначали на терезах марки Navigator (Ohaus Corporation, США). Гепатопанкреас риб використовували для приготування гомогенату, з якого одержували надосадову рідину, супернатант

і мітохондріальну фракцію, в яких визначали показники обміну вуглеводів, ліпідів, окремих мінеральних речовин, вміст протеїнів та активність ензимів.

У третьому науковому експерименті, який було проведено на коропах дворічного віку, живою вагою 730–815 г за схемою і умовами другого експерименту досліджували вплив різної концентрації синтетичного стероїду 19-нортестостерону у воді акваріума на вміст стероїдних гормонів, продуктів перекисного окиснення ліпідів і окремих ензимів їх обміну в плазмі крові та гепатопанкреасі риб. Крім того у риб дослідних і контрольної груп визначали загальний вміст протеїнів і альбумінів, а також фракційний склад білків у плазмі крові.

Метою четвертого наукового експерименту було дослідити стан покривів тіла, плавців, внутрішніх органів, морфологічний склад крові, показники обміну вуглеводів, ліпідів, окремих мінеральних елементів, активність ензимів, концентрацію стероїдних гормонів у плазмі крові та гепатопанкреасі дворічок коропа за довготривалого (72 години) впливу синтетичного стероїду 19-нортестостерону у воді. З цією метою було використано 18 коропів, з яких було сформовано контрольну, першу і другу дослідну групи по 6 екземплярів у кожній. Утримували риб в окремих акваріумах об'ємом 40 дм³. Концентрація стероїдного гормону 19-нортестостерону у воді для риб першої дослідної групи становила 50 мг/дм³, а для другої – 200 мг/дм³. У воду для риб контрольної групи 19-нортестостерон не вносили.

Під час експериментів риб не годували, але забезпечували оптимальні значення величини рН води (7,65–7,80), температури (18–20° С) і насичення киснем (6–8 мг О₂/дм³). Під час експерименту реєстрували ряд фізіологічних показників. Риб забивали через 72 год з початку експерименту, попередньо відібравши кров пункцією серця, а після забою – зразки гепатопанкреаса. Відібрані проби гепатопанкреаса гомогенізували у співвідношенні 1 г тканини на 10 мл дистильованої води та використовували для одержання супернатанту в якому визначали показники обміну вуглеводів, ліпідів, окремих мінеральних елементів, низки ензимів та вміст стероїдних гормонів.

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Визначення живої маси та індексів внутрішніх органів риб

У риб визначали живу вагу за допомогою лабораторних терезів марки Axis BDM 30 та масу внутрішніх органів, використовуючи терези Navigator (Ohaus Corporation, США). Проміри риб контролювали за гальноприйнятими в іхтіології методами [31].

Індекс тілобудови та внутрішніх органів риб розраховували за допомогою стандартного методу [27] шляхом визначення відсоткового співвідношення маси гепатопанкреаса або маси селезінки до живої ваги коропів за формулами:

- індекс тілобудови = (висота тіла (см) / жива вага (г)) x 100, %;
- індекс гепатопанкреаса = (маса органу (г) / жива вага (г)) x 100, %;
- індекс селезінки = (маса органу (г) / жива вага (г)) x 100, %.

У риб також контролювали візуально колір луски, стан слизового покриву, грудних, черевних, спинного, анального і хвостового плавців, колір зябер, очей, ротового та анального отвору [27]. Стан внутрішніх органів у риб оцінювали за масою, консистенцією, кольором, наявністю крововиливів і ексудату у черевній порожнині [31].

2.2.2. Дослідження гематологічних показників

Морфологічний склад крові у риб контролювали мануальним методом [2, 3], шляхом підрахунку кількості клітин крові у камері Горяєва, використовуючи пряму мікроскопію мазків крові. У крові риб контролювали кількість еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів, а також відсоткове співвідношення еозинофілів, лімфоцитів, сегментоядерних і паличкоядерних нейтрофілів. Лейкоцитарну формулу виводили після фіксації зразків крові риб та їх забарвлення еозином з наступною мікроскопією.

Концентрацію гемоглобіну в крові риб визначали за методом [82], принцип якого ґрунтується на утворенні ціанметгемоглобіну за взаємодії гемоглобіну

з ціаніданіонами в присутності окиснювача. Інтенсивність забарвлення розчину визначали за довжини хвилі 580 нм. Концентрацію гемоглобіну в крові риб розраховували за стандартним розчином.

2.2.3. Визначення показників обміну вуглеводів, ліпідів та мінеральних речовин

Для визначення концентрації метаболітів пластичного обміну, а також вмісту кальцію, неорганічного фосфору та заліза в плазмі крові та гепатопанкреаса риб використовували біохімічні методи [137], стандартні набори реактивів фірми «Beckman Coulter» та автоматичний біохімічний аналізатор Beckman Coulter AU-480 (США). Деякі показники обміну вуглеводів, ліпідів та активність ензимів у плазмі крові та надосадовій фракції гепатопанкреаса коропів досліджували також на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі Humalyser-2000, використовуючи стандартизовані набори хімічних реактивів фірми «Human» (Німеччина).

Підготовка проб крові та гепатопанкреаса риб для досліджень. Зразки крові риб для дослідження пластичного обміну у риб відбирали ін'єкційною голкою шляхом пункції серця у спеціальні пластикові пробірки з антикоагулянтом (гепарин). Проби перемішували та центрифугували 15 хв за 4000 об/хв. Одержували плазму крові, яку переносили у чисті скляні пробірки та охолоджували до температури + 4° С. Плазму крові використовували для досліджень показників пластичного обміну та активності ензимів. Після відбору крові, дотримуючись вимог щодо гуманного поводження з хребетними тваринами, які використовуються для експериментальних цілей, у риб видаляли внутрішні органи та відділяли гепатопанкреас і селезінку. Всі операції проводили з дотриманням температурного режиму (0–(+4)° С). Готували гомогенат гепатопанкреаса на охолодженій дистильованій воді (розведення 1:10). Проби гомогенізували за допомогою гомогенізатора Потера і тефлонового пестика після чого центрифугували 20 хв за 4000 об/хв за 4° С. Одержували надосадову рідину

в якій визначали показники пластичного обміну, активність ензимів, вміст гормонів, перекисне окиснення ліпідів.

Концентрацію глюкози в плазмі крові та надосадовій фракції гепатопанкреаса риб досліджували УФ-ферментативним методом [135], принцип якого заснований на перетворенні глюкози гексокіназою в присутності АТФ та іонів магнію до АДФ і Гл-6-Фату, який окислюється Гл-6-ФДГ у присутності НАД⁺ до глюконат-6-фосфату та НАДН Н⁺. Концентрація глюкози в пробі прямопропорційна величині абсорбції НАДН·Н⁺, яку визначали за довжини хвилі 340 нм. Стандартний набір реактивів містив: буфер (Pipes) (рН 7,6) – 24,0 ммоль/л; АТФ – 2,0 ммоль/л; НАД⁺ – 1,32 ммоль/л; Mg²⁺ – 2,37 ммоль/л; гексокіназу – 0,59 кЕ/л і Гл-6-ФДГ – 1,58 кЕ/л. Концентрацію глюкози в пробах розраховували за стандартом і виражали в ммоль/дм³ або в ммоль/г тканини.

Концентрацію тригліцеридів у плазмі крові та гепатопанкреасі риб контролювали за методом [120], в основу якого покладено визначення оптичної густини хромофору – кінцевого продукту, який утворюється внаслідок низки послідовних ферментативних реакцій у результаті дії ліпаз, гліцеролкінази, гліцеролфосфатоксидази та пероксидази на тригліцериди за довжини хвилі 660 нм. Стандартна реакційна суміш складалась із буфера (Pipes) (рН 7,5) – 50 ммоль/л; Mg²⁺ – 4,6 ммоль/л; МАДБ – 0,25 ммоль/л; АТФ – 1,4 ммоль/л; ліпази – 25 мккат/л; гліцеролкінази – 8,3 мккат/л; пероксидази – 16,3 мккат/л; аскорбатоксидази – 24,6 мккат/л і гліцерин-3-фосфатоксидази – 24,6 мккат/л. Концентрацію тригліцеридів у пробах розраховували за стандартом і виражали в ммоль/дм³ або в ммоль/г тканини.

Концентрацію холестеролу в плазмі крові та гепатопанкреасі риб контролювали ферментативним методом [120], принцип якого ґрунтується на визначенні оптичної густини хромофору, що утворюється внаслідок гідролізу ефірів холестеролу холінестеразою, з наступним окисненням утвореного вільного холестерину холестериноксидазою до холестен-3-один і перекису водню, який під дією пероксидази та за наявності 4-амінантіпірину і фенолу утворює сполуку,

інтенсивність забарвлення якої вимірювали за 540 нм. Стандартний набір реактивів містив: фосфатний буфер (рН 6,5) – 103 ммоль/л; 4-аміотрипсин – 0,31 ммоль/л; фенол – 5,2 ммоль/л; холінестеразу – 0,2 кЕ/л; холінооксидазу – 0,2 кЕ/л і пероксидазу – 10,0–0,2 кЕ/л. Вміст холестеролу у пробах розраховували за стандартом і виражали в ммоль/дм³ або в ммоль/г тканини.

Концентрацію креатиніну в плазмі крові та гепатопанкреасі риб визначали за методом [104], принцип якого ґрунтується на утворенні креатинін-пікратного комплексу за взаємодії креатиніну з пікриною кислотою в лужному середовищі та визначенні оптичної густини розчину за 520 нм. Стандартний набір реактивів містив гідроксид натрію – 120 ммоль/л та пікринову кислоту – 2,9 ммоль/л. Вміст креатиніну в пробах розраховували за стандартом і виражали в ммоль/л або в ммоль/г тканини.

Концентрацію сечовини в плазмі крові та гепатопанкреасі риб контролювали за методом [104], принцип якого заснований на взаємодії аміаку, утвореного в результаті гідролізу сечовини з 2-оксоглутаратом і НАДН·Н за участю глутаматдегідрогенази з утворенням глутамату і НАД⁺. Зміна величини поглинання НАДН пропорційна концентрації сечовини в пробах. Стандартний набір реактивів містив: трис-НСІ буфер – 100 ммоль/л; НАДН·Н – 0,26 ммоль/л; фосфат натрію – 10 ммоль/л; ЕДТА – 2,65 ммоль/л; 2-оксоглутарат – 9,8 ммоль/л; уреазу – 17,76 ммоль/л; АДФ – 2,6 ммоль/л і ГДГ – 0,16 кЕ/л. Концентрацію сечовини розраховували за стандартом і виражали в ммоль/дм³ або в ммоль/г тканини.

Концентрацію неорганічного фосфору в пробах визначали за методом [55], в основу якого покладено утворення комплексу гетерополікислот у реакції неорганічного фосфору з гептамолібдатом амонію. Оптичну густину суміші визначали за довжини хвилі 340/380 нм. Стандартний набір реактивів включав: сірчану кислоту – 200 ммоль/л; гептамолібдат амонію – 0,35 ммоль/л і гліцин – 50 ммоль/л. Концентрацію неорганічного фосфору в пробах розраховували автоматично за стандартним розчином і виражали в ммоль/дм³ або в ммоль/г тканини.

Концентрацію кальцію в плазмі крові та гепатопанкреасі риб досліджували за методом [136], в основі принципу якого покладено утворення комплексної сполуки смарагдового кольору за взаємодії іонів кальцію в лужному середовищі з о-крезолфталеїном, інтенсивність забарвлення якої пропорційна концентрації кальцію в суміші. Зміну абсорбції реакційної суміші реєстрували біхроматично за довжини хвилі 570 нм. Стандартизований набір реактивів містив етаноламін (рН 10,6) – 0,375 моль/л; 8-гідроксіхінолін – 7,16 ммоль/л і о-крезолфталеїн – 82,0 ммоль/л. Концентрацію кальцію розраховували за стандартом і виражали в ммоль/дм³ або в ммоль/г тканини.

Концентрацію заліза в плазмі крові та гепатопанкреасі риб визначали за методом [57], принцип якого заснований на реакції взаємодії іонів Fe²⁺ з хромогеном (2,4,6 – Три-(2-піридил)-5-триазин), у результаті якої утворюється комплексна сполука блакитного кольору, інтенсивність забарвлення якої вимірювали біхроматично за довжини хвилі 590 нм. Реакційна суміш містила: гліциновий буфер (рН 1,7) – 215 ммоль/л; аскорбінову кислоту – 4,7 ммоль/л і 2,4,6–Три-(2-піридил)-5-триазин – 0,5 ммоль/л. Вміст заліза в плазмі крові зв'язаного з трансферином розраховували за стандартом і виражали в мкмоль/дм³ або в мкмоль/г тканини.

2.2.4. Дослідження активності ензимів

Активність ензимів обміну вуглеводів та окремих амінокислот у плазмі крові риб, а також у надосадовій фракції, супернатанті та мітохондріях гепатопанкреаса досліджували спектрофотометричними методами, використовуючи автоматичний біохімічний аналізатор Beckman Coulter AU-480 (США). З цією метою одержували надосадову фракцію гепатопанкреаса із гомогенату приготовленого на дистильованій воді (розведення 1:10). Гомогенат гепатопанкреаса центрифугували 15 хв за 800 g і температури 4° С, відбирали надосадову фракцію, яку використовували для досліджень активності ензимів.

Окремо виділяли мітохондріальну фракцію гепатопанкреаса риб, використовуючи загальноприйнятий метод [126], з урахуванням ряду

особливостей для риб [45]. Виділяли надосадову фракцію гомогенату гепатопанкреаса, який містив 10 мМ тріс-НСІ буфер (рН 7,4), 250 мМ сахарози і 1 мМ ЕДТА шляхом центрифугування зразків 15 хв за 800 g і температури 4° С. Надосадову фракцію декантували і центрифугували за 15000 g і температури 4° С. Окремо відбирали супернатант (надосадову фракцію), а осад мітохондрій промивали охолодженим 0,25 М розчином сахарози та використовували для визначення активності ензимів.

Лактатдегідрогеназну активність (ЛДГ) (ЕС 1.1.1.27) плазми крові та надосадової фракції гепатопанкреаса риб (супернатант) досліджували за методом [36, 138], контролюючи зміну оптичної густини розчину внаслідок окислення НАДН за довжини хвилі 340 нм. Стандартний набір реактивів включав: бис-тріс-пропан (рН 7,4; 23° С) – 25 ммоль/л; НАДН – 0,18 ммоль/л і піруват – 1,2 ммоль/л. Лактатдегідрогеназну активність виражали в мкмоль НАДН за хв на 1 мг протеїну, або мкмоль НАДН за год на 1 мл плазми крові.

Для визначення лужнофосфатазної активності (ЛФ) (ЕС 3.1.3.1) плазми крові та надосадової фракції гомогенату гепатопанкреаса риб використовували метод [98], принцип якого полягає у визначенні швидкості перетворення р-нітрофенілфосфату в паранітрофенол за участі іонів магнію і акцептора фосфору – диетаноламіну. До складу стандартного набору реактивів входили: диетаноламінний буфер (рН 9,8) – 1,0 ммоль/л; магнію хлорид – 0,5 ммоль/л і пара-нітрофенілфосфат – 10 ммоль/л. Лужнофосфатазну активність виражали в мкмоль Рн за хв на 1 мг протеїну, або в мкмоль Рн за год на 1 мл плазми крові.

Креатинфосфокіназну активність (КФК) (ЕС 2.7.3.2) у плазмі крові та надосадовій рідині гепатопанкреаса риб визначали за методом [132], який включає низку ферментативних реакцій перетворення ряду субстратів за участю креатинфосфокінази, гексокінази і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в результаті чого відбувається процес відновлення НАДФ⁺, швидкість якого вимірюють за довжини хвилі 340 нм. Стандартизований набір реактивів включав: імідазол (рН 6,5; 23° С) – 100 ммоль/л; НАДФ⁺ – 2 ммоль/л; АДФ – 2 ммоль/л; АМФ – 5 ммоль/л; ЕДТА – 2 ммоль/л; глюкозу – 20 ммоль/л; креатинфосфат –

30 ммоль/л; N-ацетилстеїн – 0,2 ммоль/л; активатор – 26 ммоль/л; Mg^{2+} – 10 ммоль/л; диаденозинпентафосфат – 0,01 ммоль/л; гексокіназу – 4,0 кЕ/л і Гл-6-ФДГ – 2,8 кЕ/л. Креатинкіназну активність виражали в ммоль НАДФ⁺ за хв на 1 мг протеїну, або НАДФ⁺ на 1 мл плазми крові.

Аланінамінотрансферазну активність (АЛТ) (ЕС 2.6.1.2) у плазмі крові та надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб визначали за методом [134], який ґрунтується на реакції трансамінування аланіну і 2-оксоглутарату з утворенням глутамату і пірувату. Останній, вступаючи в реакцію з НАДН під впливом ЛДГ, перетворюється в НАД⁺, зменшуючи величину абсорбції суміші, яку вимірювали за довжини хвилі 340 нм. Робоча суміш складалась з трис-НСІ- буфера, рН 7,15 (23° С) – 100 ммоль/л; L-аланіну – 500 ммоль/л; 2-оксоглутарату – 12 ммоль/л; піридоксальфосфату – 0,1 ммоль/л; НАДН – 0,20 ммоль/л і ЛДГ – 1,8 кЕ/л. Активність ензиму виражали в ммоль НАДН/год/мл або в ммоль НАДН/хв/мг білка.

Аспаратамінотрансферазну активність (ЕС 2.6.1.1) плазми крові риб визначали за методом [134], заснованим на реакції трансамінування аспартату і 2-оксоглутарату з утворенням ацетоацетату і глутамату. Утворений оксалоацетат за участі НАДН і МДГ перетворюється на малат і НАД⁺, що змінює величину абсорбції, яку реєструють за довжини хвилі 340 нм. Стандартизована робоча суміш реактивів складалась із: три-НСІ буфер (рН 7,65; 23° С) – 80 ммоль/л; L-аспартату – 240 ммоль/л; 2-оксоглутарату – 12 ммоль/л; ЛДГ – 0,9 кЕ/л; МДГ – 0,6 кЕ/л; НАДН – 0,2 ммоль/л і піридоксальфосфату – 0,1 ммоль/л. Активність ензиму виражали в ммоль НАДН/год/мл або в ммоль НАДН/хв/мг білка.

Ізоцитратдегідрогеназну активність (ЩДГ) (ЕС 1.1.1.41) мітохондріальної фракції гомогенату гепатопанкреаса визначали, використовуючи спектрофотометричний метод [37]. В основі метода лежить здатність ЩДГ перетворювати ізоцитрат у кетоглутарат за участю НАДФ⁺, який відновлюється до НАДФН.Н, змінюючи оптичну густину розчину, яку визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 340 нм. Активність ензиму виражали

в мкмоль НАДФ⁺/ за хв на 1 мг протеїну, використовуючи методи досліджень ЩДГ.

Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназну активність (Гл-6-ФДГ) (ЕС 1.1.1.49) у мітохондріальній фракції гепатопанкреаса риб визначали спектрофотометрично, використовуючи загальноприйнятий метод [37], заснований на здатності ензиму перетворювати глюкозо-6-фосфат у 6-фосфоглюконолактон за участю НАДФН, який окисляється до НАДФ⁺. Зміну оптичної густини розчину реєстрували за довжини хвилі 340 нм. Активність ензиму виражали в мкмоль NADPH за 1 хв на 1 мг протеїну.

Лактатдегідрогеназну активність (ЛДГ) (ЕС 1.1.1.27) у надосадовій фракції гомогенату (супернатанті) досліджували за загальновідомим методом [36], принцип якого засновано на здатності ензиму каталізувати ферментативну реакцію перетворення пірувату в лактат у присутності НАДН. Зміну абсорбції реакційної суміші внаслідок окиснення NADH вимірювали за довжини хвилі 340 нм, а активність ензиму виражали в мкмоль NADH за 1 хв на 1 мг протеїну.

Глюкозо-6-фосфатазну активність (Гл-6-Фаза) (ЕС 3.1.3.9) у надосадовій фракції гомогенату (супернатанті) контролювали за методом [17], принцип якого заснований на визначенні неорганічного фосфору, який утворюється за перетворення глюкозо-6-фосфату за участю іонів Mg²⁺ в глюкозу і неорганічний фосфат. Активність ензиму виражали в мкмоль P_i за 1 хв на 1 мг протеїну.

2.2.5. Визначення показників ПОЛ

Вміст дієнових кон'югатів поліненасичених жирних кислот у плазмі крові та надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса визначали за загальноприйнятим методом [102]. В основу методу покладено принцип пероксидного окиснення поліненасичених жирних кислот, що веде до виникнення дієнових структур з максимумом поглинання за довжини хвилі 232 нм. Концентрацію дієнових кон'югатів виражали в нмоль на 1 мл плазми крові або 1 мг протеїну.

Вміст ТБК-активних продуктів (МДА) у тканинах визначали за методом наведеним в [102], використовуючи реакцію його взаємодії з 2-тіобарбітуровою кислотою, що веде до утворення триметинового комплексу, інтенсивність забарвлення якого визначали за довжини хвилі 532 нм. Концентрацію МДА виражали в нмоль на 1 мл плазми крові або на 1 мг протеїну.

Вміст гідроперекисів ліпідів у плазмі крові та надосадовій фракції гепатопанкреаса визначали за методом [101]. В основі метода лежить здатність гідроперекисів ліпідів взаємодіяти з тіоціанатом амонію, утворюючи комплексну сполуку, оптичну густина якої визначали за довжини хвилі 480 нм. Концентрацію гідроперекисів ліпідів у тканинах виражали в E_{480} на 1 мл або на 1 мг протеїну.

2.2.6. Визначення показників антиоксидантного захисту

Каталазну активність (КТ) (ЕС 1.11.1.6) крові риб визначали спектрофотометрично за методом описаним у [90]. В основу методу покладено здатність ензиму каталізувати реакцію з утворенням H_2O_2 , який взаємодіючи з молібдатом амонію забарвлює розчин внаслідок утворення комплексної сполуки, оптичну густина якої вимірюють за довжини хвилі 410 нм. Інтенсивність забарвлення розчину пропорційна активності каталази. Активність ензиму виражали в мкмоль H_2O_2 за 1 хв на 1 мг протеїну.

Супероксиддисмутазну активність (СОД) (ЕС 1.15.1.1) визначали за загальноприйнятим методом [18], принцип якого полягає у відновленні нітротетразолію супероксидними радикалами в реакції між ними і фенозилметасульфатом і НАДН. Оптичну густина розчину визначали за довжини хвилі 540 нм, а активність ензиму виражали в у. о. за 1 хв на 1 мг протеїну.

2.2.7. Визначення концентрації гормонів

Визначення концентрації циркулюючого кортизолу в плазмі крові та в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб проводили за допомогою колориметричного мікропланшетного імуноферментного аналізу

(ІФА) [41]. З цією метою використовували стандартну тест-систему AccuBind (ELISA, Microwells), реактиви та специфічні моноклональні анти-кортизол антитіла (Monobid Inc., США) і зчитувач мікроплашок «Sanrise Tekan» (Австрія). Концентрацію кортизолу розраховували за стандартною кривою і виражали в мкг на 1 декалітр.

Вміст тестостерону в плазмі крові риб та надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб визначали за методом [84], використовуючи стандартну тест-систему «Testosterone, ELISA» фірми DRG Instruments GmbH (Німеччина) та зчитувач мікроплашок і стандартні набори реактивів фірми Architect ABBOTT Diagnostic (США) згідно з інструкцією виробника. Концентрацію тестостерону в тканинах розраховували за калібрувальним графіком і виражали в нг на 1 г тканини або в нг на $1 \text{ дм}^3 \times 10^3$ плазми крові.

Вміст прогестерону в плазмі крові риб та в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб визначали за методом [139], використовуючи стандартну тест-систему DRG Progesterone ELISA («DRG Instruments GmbH», Німеччина), набори реактивів та зчитувач мікроплашок Architekt 1000SR Abbott (США) згідно з інструкцією фірми виробника. Вміст прогестерону в тканинах розраховували за допомогою стандарту і виражали в нг на 1 г тканини, або в нг на $1 \text{ дм}^3 \times 10^3$ плазми крові.

2.2.8. Дослідження вмісту та фракційного складу білків

Вміст протеїну в мітохондріальній фракції і супернатанті гомогенатів гепатопанкреаса риб контролювали за методом Лоурі [86], а в плазмі крові – за допомогою біуретового реактива [62].

Фракційний склад білків у плазмі крові риб досліджували за допомогою диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) [29], принцип якого ґрунтується на різній швидкості руху білків в електричному полі. В якості носія використовували поліакриламідний гель (ПААГ) у концентрації 4 % (концентруючий) і 10 % (розділяючий) з додаванням додецилсульфату натрію. Білки плазми крові риб фракціонували з допомогою апарату Mini-Protean Tetra Cell

(Bio-Rad), використовуючи реактиви фірми «Sigma» (США). Одержані гелі після завершення електрофорезу фіксували сумішню розчинів метанолу, формальдегіду та води у співвідношенні 6:1:7. Окремі фракції білків на гелях виявляли фарбуванням 0,1 % розчином Кумасі G-250 («Serva», Швеція). Відмивали гелі від фарби 8 % розчином оцтової кислоти за 100° С. Ідентифікацію білкових фракцій плазми крові риб проводили з допомогою білків-маркерів з молекулярною масою від 6,5 до 300 кДа. Кількісний та якісний аналіз білкових фракцій плазми крові риб на одержаних фореграмах здійснювали за спеціальною програмою Total Lab-103 і виражали у % від загального вмісту білка.

2.2.9. Статистична обробка результатів

Результати досліджень оброблено статистично [60, 79] з використанням програм MS Excel та Statistika-10.0 шляхом розрахунку середнього значення (M) показника, а також похибки середнього (m). Достовірність різниці між показниками контрольної і дослідних груп встановлювали за допомогою t-критерію Стьюдента за рівня його ймовірності $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Вплив 19-нортестостерону на зовнішні ознаки, масу внутрішніх органів і гематологічні показники риб

Вплив забруднювачів на стан внутрішніх органів, морфологічний склад крові та пластичний обмін у тканинах риб залежить від їх концентрації у воді та токсичних властивостей, що проявляється зміною фізіологічних функцій, мобілізацією захисних механізмів організму, посиленням детоксикаційної функції печінки, реакцій антиоксидантного захисту та енергетичного обміну в тканинах [6, 16, 22].

Проведеними дослідженнями встановлено, що кількість дихальних рухів у коропів першої дослідної групи, яку встановлювали за рухом зябрової кришки, до внесення у воду гормону 19-нортестостерону не відрізнялась від контролю (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Вплив 19-нортестостерону на кількість дихальних рухів у риб, дихальних рухів за 1 хвилину, $M \pm m$, $n=6$

Період досліджень	Групи		
	контрольна	дослідні	
		перша	друга
До внесення	19±2	18±3	19±2
Після внесення	18±3	19±2	18±3
Через:			
0,5 год	20±3	18±3	21±4
1,0 год	19±2	20±3	22±3
3,0 год	20±1	22±2	26±2*
12,0 год	18±2	21±2	30±3*
24,0 год	19±2	23±2	28±2*

Примітка. *Достовірна різниця ($p \leq 0,05$), порівнюючи з контролем

Не виявлено також різниці за цим показником і у риб другої дослідної групи і контролем та коропами першої дослідної групи. Одразу після внесення у воду гормону 19-нортестостерону кількість дихальних рухів у коропів першої дослідної групи також не змінювалась, порівнюючи з контролем.

Кількість дихальних рухів у коропів першої дослідної групи за концентрації 19-нортестостерону у воді 50 мкг/дм^3 через 0,5, 1 і 3 години з моменту внесення гормону також не зазнавала змін, порівнюючи з контролем. Вказаний показник становив у середньому 18–20 дихальних рухів за хвилину і не відрізнявся від його значень у коропів контрольної групи (табл. 3.1). Збільшення тривалості перебування риб першої дослідної групи у воді із 19-нортестостероном до 12 і 24 годин також не впливало на кількість дихальних рухів, порівнюючи з контролем. На основі одержаних даних можна зробити висновок про те, що незначна концентрація 19-нортестостерону у воді не впливає на такий важливий фізіологічний показник риб, як інтенсивність дихання.

Підвищення концентрації 19-нортестостерону у воді до 200 мкг/дм^3 збільшувало кількість дихальних рухів у коропів, але їх значення залежало від тривалості дії досліджуваного стероїду. Слід зазначити, що за нетривалої дії гормону 19-нортестостерону кількість дихальних рухів у риб другої групи через 0,5 і 1 годину не змінювалась, порівнюючи з контролем (табл. 3.1). Однак, через 3, 12 та 24 години цей показник у риб другої дослідної групи значно підвищувався, у середньому в 1,47–1,67 рази, не дивлячись на відсутність різниці щодо вмісту кисню у воді акваріумів. Кількість дихальних рухів у риб другої дослідної групи через 3, 12 і 24 години з моменту внесення гормону у воду акваріума також виявилась вищими відповідно у 1,4 і 1,5 рази, порівнюючи із значенням цього показника у коропів першої дослідної групи. Підвищення кількості дихальних рухів у риб другої дослідної групи є, ймовірно, одним із компенсаторних механізмів у відповідь на збільшення потреби коропів у кисні внаслідок активації енергетичного обміну та біосинтетичних процесів у тканинах під впливом синтетичних стероїдів [17, 18].

У проведеному експерименті встановлено, що витримування коропів у воді з концентрацією 19-нортестостерону 50 мкг/дм^3 впродовж 24 годин не впливало на їх живу вагу та довжину тіла, порівнюючи з контролем (табл. 3.2). Подібні результати одержано і щодо живої ваги та довжини тіла у риб другої дослідної групи за підвищення концентрації 19-нортестостерону у воді до 200 мкг/дм^3 .

Таблиця 3.2

Жива вага, довжина тіла, маса й індекс гепатопанкреаса та селезінки риб за дії 19-нортестостерону, $M \pm m$, $n=6$

Показник	Групи		
	контрольна	дослідна	
		перша	друга
Жива вага, г	$826,46 \pm 31,60$	$777,60 \pm 11,49$	$720,60 \pm 54,58$
Довжина тіла, см	$38,44 \pm 0,52$	$37,90 \pm 0,53$	$36,54 \pm 1,09$
Маса гепатопанкреаса, г	$14,4 \pm 1,72$	$10,34 \pm 0,93$	$12,02 \pm 1,73$
Маса селезінки, г	$5,34 \pm 0,38$	$4,02 \pm 0,59$	$4,56 \pm 0,45$
Індекс гепатопанкреаса, %	$1,71 \pm 0,15$	$1,33 \pm 0,18$	$1,66 \pm 0,13$
Індекс селезінки, %	$0,65 \pm 0,12$	$0,52 \pm 0,05$	$0,63 \pm 0,08$

Примітка. *Достовірна різниця ($p \leq 0,05$), порівнюючи з контролем

Не встановлено також змін зовнішніх ознак коропів дослідних груп за нетривалого впливу 19-нортестостерону. Досліджуваний синтетичний стероїд у концентрації 50 і 200 мкг/дм^3 у воді не впливав на покрив тіла та колір луски, райдужну оболонку очей, колір та стан грудних, черевних, спинного, анального та хвостового плавців у коропів першої та другої дослідних груп, порівнюючи з контролем, що ймовірно пов'язано з нетривалою дією вказаного гормону на риб.

В експерименті не вдалось встановити і змін внутрішніх органів риб за дії 19-нортестостерону. Так, досліджуваний стероїд за концентрації 50 мкг/дм^3 води не впливав на масу та індекс гепатопанкреаса у риб першої дослідної групи, порівнюючи з контролем (табл. 3.2). Не виявлено також зміни вказаних

показників і у риб другої дослідної групи, які перебували у воді з концентрацією 19-нортестерону 200 мкг/дм³.

Не встановлено також впливу 19-нортестостерону на масу та індекс селезінки у коропів першої дослідної групи, основного кровотворного органу у кісткових риб, значення яких не відрізнялось від контролю (табл. 3.2). Збільшення концентрації 19-нортестостерону у воді до 200 мкг/дм³, тобто у 4 рази порівнюючи з першою, також не впливало на масу та індекс селезінки коропів, порівнюючи з контролем.

Відсутність впливу 19-нортестостерону на масу та індекс селезінки у риб підтверджено дослідженнями гематологічних показників у риб дослідних груп. В експерименті не виявлено різниці між концентрацією гемоглобіну, кількістю лейкоцитів, еритроцитів і швидкістю їх осідання у риб першої дослідної групи і їх значенням у коропів контрольної групи через 24 години експерименту (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Гематологічні показники риб за впливу 19-нортестостерону, $M \pm m$, $n=6$

Показник	Групи		
	контрольна	дослідна	
		перша	друга
1	2	3	4
Гемоглобін, г/дм ³	87,25±10,25	89,66±7,45	90,00±11,51
Еритроцити, Т/дм ³	1,40±0,15	1,36±0,09	1,29±0,07
Лейкоцити, Г/дм ³	4,88±0,37	4,55±0,16	3,90±0,36
Швидкість осідання еритроцитів, мм/год	2,66±0,20	1,91±0,41	1,41±0,41*
Еозинофіли, %	2,41±0,97	1,83±0,46	1,58±0,42
Нейтрофіли, %			
- паличкаядерні	0	0	0
- сегментоядерні	51,16±2,95	49,16±8,35	42,66±8,63

Продовження таблиці 3.3

1	2	3	4
Лімфоцити, %	43,33±3,94	45,53±9,60	52,83±9,30
Моноцити, %	3,08±0,58	3,41±0,91	2,91±0,41

Примітка. *Достовірна різниця ($p \leq 0,05$), порівнюючи з контролем

Встановлено, що співвідношення еозинофілів, паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів, лімфоцитів і моноцитів у крові коропів першої дослідної групи також не відрізнялось від контролю. Відсутність впливу досліджуваного синтетичного стероїду на морфологічний склад крові риб першої дослідної групи ймовірно пов'язаний з низькою концентрацією у воді і нетривалим впливом на коропів.

Не виявлено також впливу 19-нортестостерону на концентрацію гемоглобіну, кількість еритроцитів, лейкоцитів і тромбоцитів у крові риб другої дослідної групи за підвищення його концентрації у воді до 200 мкг/дм³ (табл. 3.4). Досліджуваний стероїд у вказаній концентрації у воді не змінював також співвідношення еозинофілів, паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів, лімфоцитів і моноцитів у крові риб другої дослідної групи. Вказані показники морфологічного складу крові у риб другої дослідної групи не відрізнялись від їх значень у коропів першої дослідної групи. Однак, як встановлено дослідженнями, у риб другої дослідної групи під впливом 19-нортестостерону знизилась у 1,87 рази швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ), порівнюючи з контролем, що може бути наслідком збільшення кількості альбумінів та зміни співвідношення інших фракцій білків у плазмі крові. Відсутність впливу 19-нортестостерону на морфологічний склад крові у риб, навіть за високої концентрації у воді, пов'язано із його першочерговим впливом на вміст ендогенних стероїдів та метаболічні процеси в тканинах, що було підтверджено подальшими дослідженнями.

Отже, синтетичний стероїд 19-нортестостерон за низької концентрації у воді і нетривалої дії не впливає, а за високої знижує показник ШОЕ крові, що змінює транспортну функцію еритроцитів крові.

3.2. Вміст стероїдних гормонів та перекисне окиснення ліпідів у тканинах риб за впливу 19-нортестостерону

Встановлено, що 19-нортестостерон, концентрація якого у воді акваріума становила 200 мкг/дм³, змінював вміст стероїдних гормонів у тканинах риб, а за рівня 50 мкг/дм³ не впливав на вказані показники. Виявилось, що концентрація тестостерону, основного попередника стероїдного гормону у кісткових риб 11-кетотестостерону, у плазмі крові риб першої дослідної групи не змінювалась, порівнюючи з контролем (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Вміст стероїдних гормонів у плазмі крові та гепатопанкреасі риб під впливом 19-нортестостерону, $M \pm m$, $n=5$

Гормон	Групи		
	контрольна	дослідна	
		перша	друга
Плазма крові			
Тестостерон, нг/дм ³ ×10 ⁻³	0,37±0,05	0,38±0,04	0,57±0,03***
Прогестерон, нг/дм ³ ×10 ⁻³	0,61±0,15	0,60±0,18	0,21±0,03***
Кортизол, мкг/дл	30,66±4,89	29,38±5,47	5,30±1,40***
Гепатопанкреас			
Тестостерон, нг/г тканини	9,58±2,71	8,73±1,52	42,95±13,32***
Прогестерон, нг/г тканини	2,03±0,33	2,30±0,26	4,58±0,61***
Кортизол, мкг/дл	1,89±0,28	1,98±0,24	3,71±1,34***

Примітка. *Досторівна різниця ($p \leq 0,05$), порівнюючи з контролем, **порівнюючи з показниками першої дослідної групи

Не виявлено також відмінностей і за вмістом прогестерону у плазмі крові риб першої дослідної групи та контролю. Концентрація кортизолу у плазмі крові риб першої дослідної групи також не змінювалась, порівнюючи з його рівнем у коропів контрольної групи. Отже, 19-нортестостерон за концентрації 50 мкг/дм³

не впливав на вміст кортизолу, тестостерону і прогестерону в плазмі крові коропів першої дослідної групи, порівнюючи з контролем, що ймовірно пов'язано із незначним вмістом цього ксенобіотика у воді акваріума та нетривалим впливом на риб. Вказаний висновок підтверджено результатами досліджень концентрації стероїдних гормонів у надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб першої дослідної групи. Встановлено, що концентрація тестостерону в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса коропів першої дослідної групи відповідала його рівню у риб контрольної групи (табл. 3.4).

Не виявлено також різниці за вмістом прогестерону та кортизолу в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб контрольної і першої дослідної групи. На підставі одержаних результатів можна зробити висновок про те, що кісткові риби здатні адаптуватись до незнаної концентрації 19-нортестостерону у воді, не змінюючи водночас вміст стероїдних гормонів у тканинах.

Збільшення концентрації 19-нортестостерону у воді акваріума до 200 мкг/дм³, навіть за нетривалої експозиції, змінює вміст стероїдних гормонів у плазмі крові та надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб, порівнюючи з контролем. У плазмі крові риб другої дослідної групи концентрація тестостерону у плазмі крові збільшилась у 1,5 рази, а прогестерону і кортизолу навпаки зменшилась відповідно у 2,9 і 5,8 рази (табл. 3.4). Встановлено також значну різницю за вмістом тестостерону у плазмі крові коропів другої і першої дослідної груп. Порівнюючи з першою дослідною групою, концентрація вказаного гормону у плазмі крові риб другої групи виявилась вищою у 1,5 рази. Вміст прогестерону і кортизолу в плазмі крові риб другої дослідної групи, порівнюючи з першою, навпаки знизився відповідно у 2,86 і 5,54 рази. Дещо інший характер впливу 19-нортестостерону на концентрацію стероїдних гормонів у надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса встановлено у коропів другої дослідної групи. Виявлено, що концентрація тестостерону в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб другої дослідної групи, як і в плазмі крові, збільшилась у 4,4 рази, порівнюючи з контролем (табл. 3.4). На відміну від плазми

крові концентрація прогестерону в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб другої дослідної групи підвищилась у 2,26 рази, а кортизолу – у 1,96 рази, порівнюючи з аналогічними показниками у коропів контрольної групи.

Значні відмінності за вмістом досліджуваних стероїдних гормонів у надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса встановлено у риб першої та другої дослідних груп. Концентрація тестостерону у надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб другої дослідної групи, порівнюючи з першою, виявилась вищою у 4,9 рази, прогестерону – у 2,0 рази і кортизолу – у 1,87 рази.

Отже, 19-нортестостерон, будучи синтетичним аналогом тестостерону, за концентрації у воді 200 мкг/дм³ ймовірно конкурує із ендогенними стероїдами за центри зв'язування, унаслідок чого підвищується їх вміст у тканинах риб. З цим фактом, ймовірно, пов'язане підвищення концентрації стероїдних гормонів у гепатопанкреасі риб другої дослідної групи, порівнюючи з першою.

Одержані дані свідчать, що до незначної концентрації 19-нортестостерону у воді, зокрема 50 мкг/дм³, кісткові риби адаптуються без зміни вмісту стероїдних гормонів у тканинах, а за більш високих концентрацій стероїдів у воді їх рівень в організмі риб значно зростає, що свідчить про їх участь у регуляції пристосувальних механізмів у гідробіонтів.

Вплив різних за властивостями та хімічним складом стероїдів на риб залежить від їх концентрації у воді, тривалості дії і характеризується активацією адаптаційних механізмів, зокрема процесів перекисного окиснення ліпідів.

Встановлено, що 19-нортестостерон підвищує в плазмі крові риб першої дослідної групи, порівнюючи з контролем, концентрацію МДА у 1,15 рази, а дієнових кон'югатів – у 1,31 рази і не впливає на вміст гідроперекисів ліпідів (табл. 3.5). Дослідження ряду ферментів системи антиоксидантного захисту показало, що каталазна активність у плазмі крові коропів першої дослідної групи підвищилась у 1,44 рази, СОД активність – у 1,34 рази, порівнюючи з контролем, не дивлячись на відсутність змін щодо вмісту гідроперекисів ліпідів (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

**Показники перекисного окиснення ліпідів, каталазна та СОД активності
у плазмі крові риб за дії 19-нортестостерону, $M \pm m$, $n=6$**

Показник	Контрольна група	Дослідні групи	
		перша	друга
МДА, нмоль/мл	2,71±0,11	3,17±0,05*	3,65±0,12*
Гідроперекиси ліпідів, од.Е 480/мл	1,63±0,05	1,89±0,07	1,96±0,11*
Дієнові кон'югати, нмоль/мг білка	0,58±0,01	0,76±0,05*	0,81±0,03*
Каталазна активність, мкмоль H ₂ O ₂ /хв./мг білка	1,62±0,06	2,34±0,07*	2,97±0,02*
СОД активність, у.о./хв. /мг білка	3,41±0,05	4,56±0,08*	4,99±0,1*

Примітка. *Достовірна різниця ($p \leq 0,05$), порівнюючи з контролем

У риб другої дослідної групи, яких витримували у воді з концентрацією 19-нортестостерону 200 мкг/дм³ вміст МДА у плазмі крові також виявився вищим у 1,33 рази, а дієнових кон'югатів – у 1,40 рази, порівнюючи з контролем. Водночас каталазна активність у плазмі крові підвищилась у 1,83 рази, а СОД активність – у 1,46 рази (табл. 3.5). Однак, у риб другої дослідної групи, не дивлячись на значне підвищення концентрації 19-нортестостерону у воді, вміст МДА, дієнових кон'югатів, каталазна і СОД активності у плазмі крові не відрізнялись від їх значень у коропів першої дослідної групи, яких витримували у воді із значно нижчим вмістом стероїду. Встановлені зміни концентрації МДА і дієнових кон'югатів, а також каталазної і СОД активності у плазмі крові риб дослідних груп, порівнюючи з контролем, можна пояснити впливом 19-нортестостерону на процеси ПОЛ в гепатопанкреасі та інших органах і тканинах.

Отже, одержані результати засвідчують не тільки вплив 19-нортестостерону на процеси ПОЛ в тканинах риб, але і розкривають важливу роль ліпідів у механізмі адаптації кісткових риб до дії синтетичних стероїдів.

У риб дослідних груп встановлено зміну концентрації продуктів ПОЛ та ензимів системи антиоксидантного захисту в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса, порівнюючи з їх значеннями у коропів контрольної групи.

Таблиця 3.6

Показники перекисного окиснення ліпідів, каталазна і СОД активності у гепатопанкреасі риб за дії 19-нортестостерону, $M \pm m$, $n=5$

Показник	Контрольна група	Дослідні групи	
		перша	друга
МДА, нмоль/мг білка	2,23±0,03	2,58±0,02*	2,87±0,03*
Каталазна активність, мкмоль H ₂ O ₂ /хв./ мг білка	48,5±0,23	59,71±0,31*	64,32±0,26*
Дієнові кон'югати, нмоль/мг білка	0,71±0,07	1,67±0,11*	2,11±0,09***
СОД активність, у.о./хв/мг білка	11,23±0,12	16,97±0,16*	19,88±0,21***

Примітка. *Достовірна різниця ($p \leq 0,05$), порівнюючи з контролем, **порівнюючи з показниками першої дослідної групи

Встановлено, що у риб першої дослідної групи, порівнюючи з контролем, концентрація МДА в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса підвищилась у 1,16 рази, а дієнових кон'югатів – у 2,35 рази (табл. 3.6). Каталазна активність у надосадовій фракції гепатопанкреаса підвищилась – у 1,23 рази, а СОД активність зросла у 1,51 рази. Підвищення вмісту дієнових кон'югатів у надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса коропів дослідних груп імовірно є наслідком зростання каталазної і СОД активності та свідчить про посилення процесів ПОЛ в тканинах під впливом синтетичних стероїдів.

Концентрація МДА в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса коропів другої дослідної групи виявилась також вищою у 1,29 рази, дієнових кон'югатів – у 2,97 рази, каталазна активність – у 1,33 рази, а СОД активність – у 1,77 рази, порівнюючи з аналогічними даними у риб контрольної групи

(табл. 3.6). У надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб другої дослідної групи встановлено, на відміну від плазми крові, підвищення у 1,26 рази концентрації дієнових кон'югатів і у 1,17 рази СОД активності, порівнюючи з коропами першої дослідної групи, не дивлячись на те, що за вмістом МДА і каталазною активністю відмінностей не встановлено. Підвищення концентрації МДА в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб першої та другої дослідних груп, який утворюється із гідропероксидів ліпідів у клітинах під впливом 19-нортестостерону, відбулося ймовірно внаслідок впливу синтетичних стероїдів на метаболічні процеси, зокрема обмін енергетичних субстратів. Вказаний висновок доведено подальшими дослідженнями показників метаболізму вуглеводів, ліпідів, енергетичного обміну та ензимної активності різних фракцій гомогенату гепатопанкреаса риб дослідних груп за дії 19-нортестостерону.

3.3. Показники обміну вуглеводів, ліпідів та вміст макро- і мікроелементів у тканинах риб за впливу 19-нортестостерону

За впливу синтетичного стероїду 19-нортестостерону на вміст ендогенних стероїдних гормонів в організмі риб, зокрема тестостерону, прогестерону і кортизолу в гепатопанкреасі та, враховуючи їх роль у регуляції низки метаболічних процесів в органах-мішенях, слід було очікувати і змін окремих показників проміжного обміну в тканинах.

У коропів першої дослідної групи, яких утримували впродовж 24 годин у воді з концентрацією 19-нортестостерону 50 мкг/дм³, порівнюючи з контролем, підвищилась концентрація білка в плазмі крові у 1,31 рази, а альбумінів – у 1,36 рази, що свідчить про стимуляцію синтетичними стероїдами біосинтезу протеїнів у тканинах риб (табл. 3.7).

За вказаної концентрації 19-нортестостерону у воді вміст глюкози, тригліцеридів і креатиніну в плазмі крові риб першої дослідної групи щодо контролю не змінювався. Водночас концентрація неорганічного фосфору

та заліза в плазмі крові коропів цієї групи знизилась відповідно у 1,98 і 2,69 рази, тоді як вміст кальцію не змінювався (табл. 3.7). Одержані дані підтверджують висновок про те, що у кісткових риб, як і в теплокровних тварин, 19-нортестостерон проявляє анаболічний ефект, стимулюючи біосинтез протеїнів у тканинах.

Таблиця 3.7

**Концентрація білка та показники обміну речовин в плазмі крові риб
за впливу 19-нортестостерону, $M \pm m$, $n=5$**

Показник	Групи		
	контрольна	дослідна	
		перша	друга
Білок, г/дм ³	24,08±1,62	31,64±1,23*	30,92±2,54*
Альбуміни, г/дм ³	6,06±0,30	8,24±0,43*	7,86±0,34*
Глюкоза, ммоль/дм ³	7,03±0,63	5,00±0,57	4,86±0,55*
Тригліцериди, мкмоль/дм ³	1,18±0,23	1,34±0,15	1,48±0,18
Креатинін, ммоль/дм ³	11,60±0,75	11,80±0,37	11,20±0,49
Кальцій, ммоль/дм ³	2,39±0,27	2,04±0,06	2,04±0,07
Фосфор (неорганічний), ммоль/дм ³	2,04±0,42	1,03±0,24*	1,30±0,20*
Залізо, мкмоль/дм ³	10,94±1,43	4,06±0,70*	3,14±0,81*

Примітка. *Достовірна різниця ($p \leq 0,05$), порівнюючи з контролем

Дослідженнями також встановлено, що підвищення концентрації 19-нортестостерону у воді до 200 мкг/дм³ впливало на вміст окремих показників обміну речовин у тканинах риб більшою мірою ніж у коропів, яких утримували впродовж 24 годин у воді з концентрацією гормону 50 мкг/дм³. У риб другої дослідної групи, порівнюючи з контролем концентрація білка в плазмі крові підвищилась у 1,28 рази, а альбумінів – у 1,3 рази (табл. 3.7). За вказаних умов досліді вміст глюкози в плазмі крові коропів другої дослідної групи знизився у 1,45, а фосфору і заліза відповідно у 1,6 і 3,48 рази, порівнюючи з контролем. Вміст тригліцеридів і креатиніну в плазмі крові риб другої дослідної групи за дії

високої концентрації 19-нортестостерону у воді не змінювався, порівнюючи з контролем.

Однак, не дивлячись на значне підвищення концентрації 19-нортестостерону у воді акваріума, у риб другої дослідної групи не було збільшення вмісту білка і альбумінів у плазмі крові, порівнюючи з їх рівнем у коропів першої дослідної групи. У риб першої та другої дослідної груп не виявлено також різниці за вмістом глюкози, тригліцеридів і креатиніну в плазмі крові. Концентрація кальцію, неорганічного фосфору і заліза в плазмі крові риб другої дослідної групи не відрізнялась від аналогічних показників у коропів першої дослідної групи, не дивлячись на значну зміну концентрації ендогенних стероїдних гормонів у тканинах (табл. 3.7).

Водночас проведеними дослідженнями встановлено значний вплив синтетичного стероїду 19-нортестостерону на обмін речовин у гепатопанкреасі риб, зокрема на вміст глюкози, рівень якої залежав від концентрації гормону у воді (табл. 3.8). Виявлено значне підвищення вмісту глюкози у 3,34 рази в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб першої дослідної групи, які знаходились впродовж 24 годин у воді з концентрацією 19-нортестостерону 50 мкг/дм³, порівнюючи з контролем. Вміст глюкози в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб, які знаходились у воді з концентрацією 19-нортестостерону 200 мкг/дм³, порівнюючи з контролем, також збільшився у 4,42 рази. Зареєстровано підвищення рівня глюкози у 1,32 рази в гепатопанкреасі риб другої дослідної групи, порівнюючи з першою дослідною групою.

Отже, встановлено значне підвищення концентрації глюкози в гепатопанкреасі риб дослідних груп, що зумовлено ймовірно стимуляцією 19-нортестостероном енергетичних процесів, внаслідок посилення біосинтезу білка в тканинах, що потребує додаткових джерел енергії шляхом розщеплення глікогену та синтезу глюкози із глікогенних амінокислот.

Таблиця 3.8

**Концентрація білка та показники обміну речовин у гепатопанкреасі риб
за впливу 19-нортестостерону, $M \pm m$, $n=6$**

Показник	Контрольна група	Дослідні групи	
		перша	друга
Загальний білок, мг/г тканини	32,03±1,52	49,76±2,41*	52,74±4,33*
Альбумін, мг/г тканини	6,72±0,75	16,09±1,06*	14,78±0,73*
Глюкоза, мкмоль/г тканини	35,61±10,12	118,85±11,74*	157,50±9,86***
Тригліцериди, мкмоль/г тканини	1,32±0,31	2,34±0,33*	2,09±0,20*
Креатинін, нмоль/г тканини	40,00±15,36	83,3±6,70*	76,74±13,31*
Кальцій, мкмоль/г тканини	1,23±0,31	1,33±0,35	1,09±0,20
Фосфор (нерг.), мкмоль/г тканини	7,74±0,36	11,5±0,27*	12,93±2,04*
Залізо, нмоль/г тканини	49,05±0,62	101,34±19,51*	88,06±10,11*

Примітка. *Достовірна різниця ($p \leq 0,05$), порівнюючи з контролем, **порівнюючи з даними першої дослідної групи

Кісткові риби потребу в енергетичних ресурсах задовольняють не тільки за рахунок окислення глюкози, ряду глікогенних амінокислот, але і тригліцеридів, які є джерелом енергетичних субстратів – гліцерину та жирних кислот.

Встановлено підвищення вмісту тригліцеридів у надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб першої дослідної групи у 1,77, а другої дослідної групи – у 1,54 рази, порівнюючи з контролем (табл. 3.8). Ймовірно ці зміни викликані підвищенням потреби риб у енергетичних ресурсах під впливом синтетичного стероїду 19-нортестостерону, необхідних для реалізації анаболічного ефекту.

Синтетичний стероїд 19-нортестостерон стимулював біосинтез протеїнів у тканинах риб, на що вказує підвищення у 1,5 рази концентрації загального білка

і в 2,4 рази альбумінів у надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб першої дослідної групи і відповідно у 1,6 і 2,2 рази другої дослідної групи (табл. 3.8). Аналізуючи одержані дані, слід відмітити, що стимулюючий вплив 19-нортестостерону на біосинтетичні процеси у коропів спостерігається за концентрації у воді 50 мкг/дм³, і не посилюється з подальшим зростанням його рівня до 200 мкг/дм³. Крім того встановлено збільшення у 2,1 рази концентрації креатиніну в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб першої дослідної групи і у 1,9 рази – другої дослідної групи, порівнюючи з контролем, як одного із важливих компонентів макроергів у м'язах (табл. 3.8). У риб першої дослідної групи, порівнюючи з контролем, зросла у 1,5 рази також концентрація неорганічного фосфору в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса, що корелює із підвищенням вмісту креатиніну в тканинах.

Водночас за значного підвищення концентрації стероїдного гормону 19-нортестостерону у воді до 200 мкг/дм³ подальшого зростання вмісту неорганічного фосфору в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб, порівнюючи з аналогічними даними у коропів першої дослідної групи, не встановлено. Однак його рівень у цьому органі риб другої дослідної групи залишався вищим у 1,67 рази ніж у коропів контрольної групи. Синтетичний стероїд 19-нортестостерон за досліджуваних концентрацій у воді не впливав на вміст кальцію в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб першої та другої дослідної групи, але підвищував концентрацію заліза, важливого компонента низки ензимів енергетичного обміну в тканинах риб. У риб першої дослідної групи його вміст у надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса підвищився у 2,07 рази, а у другої – у 1,80 рази, порівнюючи з контролем (табл. 3.8).

На підставі проведених досліджень можна зробити висновок про стимуляцію 19-нортестостероном енергетичного обміну та біосинтетичних процесів у тканинах кісткових риб, які залежать від його концентрації у воді.

Отже, як встановлено дослідженнями, синтетичні стероїди додані у воду у різній концентрації проявляють в організмі риб анаболічні властивості,

активують реакції енергетичного обміну і впливають на концентрацію основних макро- та мікроелементів.

3.4. Активність ензимів у тканинах риб за дії 19-нортестостерону

Встановлено, що ензимна активність у плазмі крові та гепатопанкреасі риб, яких витримували у воді з різною концентрацією 19-нортестостерону впродовж 24 годин, змінюється. Виявилось, що креатинфосфокіназна активність у плазмі крові у риб першої дослідної групи за концентрації 19-нортестостерону у воді 50 мкг/дм³ зросла у 1,76 рази, а аспартатамінотрансферазна активність – у 1,31 рази, тоді як лужнофосфатазна і аланінамінотрансферазна активність навпаки знизилась відповідно у 2,1 і 1,58 рази, а лактатдегідрогеназна – не змінювалась, порівнюючи з контролем (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

Ензимна активність у плазмі крові риб за впливу 19-нортестостерону, M±m, n=5

Показник	Групи		
	контрольна	дослідні	
		перша	друга
1	2	3	4
Лактатдегідрогеназна активність, мкмоль НАДН/год/мл	214,75±25,79	236,80±21,31	255,40±16,32
Лужнофосфатазна активність, мкмоль Рн/год/мл	183,80±16,64	87,80±9,37*	41,18±9,09***
Креатинфосфокіназна активність, мкмоль НАДФ ⁺ /год/мл	17,29±0,32	30,36±4,69*	27,19±3,95*
Аланінамінотрансферазна активність, мкмоль НАДН/год/мл	183,80±18,43	116,60±22,59*	134,00±21,36
Аспартатамінотрансферазна активність, мкмоль НАДН/год/мл	162,40±19,57	212,20±12,07*	222,50±16,80*

Примітка. *Достовірна різниця ($p \leq 0,05$) щодо контролю, ** щодо даних у риб першої групи

З підвищенням концентрації 19-нортестостерону у воді до 200 мкг/дм³ активність ензимів у плазмі крові коропів змінювалась. У плазмі крові риб другої дослідної групи, які знаходились у воді з концентрацією 19-нортестостерону 200 мкг/дм³, креатинфосфокіназна активність підвищилась у 1,57 рази, аспартатамінотрансферазна – у 1,4 рази, а лужнофосфатазна і аланінамінотрансферазна активності навпаки знизились відповідно у 1,37 і 4,46 рази, тоді як лактатдегідрогеназна – не змінювалась, порівнюючи з контролем.

Крім того лужнофосфатазна активність у плазмі крові риб другої дослідної групи виявилась нижчою у 2,13 рази, а лактатдегідрогеназна, аланінамінотрансферазна, аспартатамінотрансферазна і креатинфосфокіназна – не відрізнялись від аналогічних показників у коропів першої дослідної групи (табл. 3.9).

Одержані результати дають підставу зробити висновок про те, що реакція кісткових риб на дію синтетичного анаболічного стероїда 19-нортестостерону залежить від його концентрації у воді і супроводжується зміною активності низки ензимів у плазмі крові і, як показали подальші дослідження, в гепатопанкреасі риб.

Одним із можливих шляхів впливу синтетичних стероїдів на метаболізм у тканинах кісткових риб, як показали подальші дослідження, є зміна активності ензимів окиснення енергетичних субстратів у тканинах. Встановлено підвищення у 1,79 рази лактатдегідрогеназної активності в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб першої дослідної групи, порівнюючи з контролем (табл. 3.10). Оскільки вказаний ензим каталізує реакцію перетворення пірувату в лактат за участю NADH, це свідчить про вплив 19-нортестостерону не тільки на редокс-потенціал клітин гепатопанкреаса, але і на активацію реакцій анаеробного окиснення глюкози в тканинах риб. Відомо, що стероїдні гормони у риб підвищують активність ферментів глюконеогенезу в печінці, одночасно стимулюючи окиснення глюкози в м'язах. За концентрації цього ксенобіотика у воді 200 мкг/дм³ подальшого підвищення лактатдегідрогеназної активності

в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб не спостерігалось, але її активність залишалась вищою ніж у контролі.

Таблиця 3.10

Активність ензимів у надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб за дії 19-нортестостерону, $M \pm m$, $n=5$

Показник	Групи		
	контрольна	дослідні	
		перша	друга
Лужнофосфатазна активність, мкмоль Рн/хв/л	3,68±0,67	35,33±1,45*	20,33±10,48*.*
Аланінамінотрансферазна активність, ммоль НАДН/хв/л	1,58±0,23	3,00±0,24*	3,25±0,27*
Аспартатамінотрансферазна активність, ммоль НАДН/хв/л	0,84±0,31	1,57±0,14*	1,89±0,41*
Креатинфосфокіназна активність, ммоль НАДФ ⁺ /хв/л	1,47±0,07	2,96±0,45*	1,75±0,27**
Лактатдегідрогеназна активність, ммоль НАДН/хв/л	6,09±0,36	10,89±0,89*	10,01±1,40*

Примітка. *Достовірна різниця ($p \leq 0,05$), порівнюючи з контролем, **порівнюючи з даними у риб першої групи

Синтетичний стероїд 19-нортестостерон стимулює реакції переамінування глюкогенних амінокислот аланіну та аспартату в гепатопанкреасі коропів. Встановлено підвищення аланінамінотрансферазної і аспартатамінотрансферазної активності відповідно у 1,90 і 2,06 рази в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб першої та другої дослідної груп, порівнюючи з контролем (табл. 3.10). Крім того у вказаній фракції гепатопанкреаса коропів першої дослідної групи креатинфосфокіназна активність зросла у 2,01 рази, порівнюючи з контролем, що ймовірно свідчить, зважаючи на роль цього ензиму в обміні макроергів, про активацію синтетичними стероїдами

у риб енергетичного обміну в тканинах. Це ймовірно може бути відповіддю метаболізму на збільшення потреби в енергетичних ресурсах під час адаптації риб до дії синтетичних стероїдів у воді. Однак, з підвищенням концентрації 19-нортестостерону до 200 мкг/дм³ у воді креатинфосфокіназна активність у надосадовій рідині гомогенату гепатопанкреаса риб другої дослідної групи, порівнюючи з першою, не змінювалась, однак залишалась вищою ніж у контролі (табл. 3.10). Показано, що 19-нортестостерон підвищував лужнофосфатазну активність у надосадовій рідині гомогенату гепатопанкреаса, яка у риб першої дослідної групи зросла у 9,63 рази, а у другої – у 5,54 рази, порівнюючи з контролем. Значне підвищення активності ЛФ в гепатопанкреасі риб дослідних груп пов'язане ймовірно із збільшенням потреби тканин у неорганічному фосфорі, необхідного для синтезу АТФ. Значний вплив 19-нортестостерону на лужнофосфатазну активність у надосадовій рідині гомогенату гепатопанкреаса риб може бути одним із критеріїв біотестування природних водойм забруднених синтетичними стероїдами. Водночас слід відмітити, що за концентрації 19-нортестостерону у воді 200 мкг/дм³ лужнофосфатазна активність у гепатопанкреасі риб другої дослідної групи, порівнюючи з першою, виявилась нижчою у 1,74 рази, що свідчить про гальмуючий вплив високої концентрації 19-нортестостерону у воді на процеси перетворення фосфорорганічних сполук у тканинах риб.

Встановлено стимулюючий вплив синтетичного стероїду 19-нортестостерону у воді на ензимну активність у тканинах риб дослідних груп. Слід відмітити, що найбільші зміни ферментативної активності у різних фракціях гепатопанкреаса риб спостерігаються за концентрації 19-нортестостерону у воді 50 мкг/дм³. Однак, за підвищення його рівня у воді до 200 мкг/дм³, подальшого збільшення ензимної активності у досліджуваних фракціях гепатопанкреаса риб другої дослідної групи не спостерігалось.

У супернатанті гомогената гепатопанкреаса коропів першої та другої дослідних груп, порівнюючи з контролем, лактатдегідрогеназна активність зросла відповідно у 1,4 та 1,5 рази. Глюкозо-6-фосфатазна активність у коропів першої

дослідної групи підвищилась у 1,48, а другої – у 1,80 рази, порівнюючи з аналогічними показниками у риб контрольної групи. Відомо, що глюкозо-6-фосфатаза є одним із ключових ензимів синтезу глюкози, а зростання її активності вказує на стимуляцію синтетичними стероїдами глюконеогенезу в тканинах (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

**Ензимна активність у мітохондріальній фракції та супернатанті
гепатопанкреаса риб за дії 19-нортестостерону, $M \pm m$, $n=5$**

Показник	Контрольна група	Дослідні групи	
		перша	друга
Супернатант			
Лактатдегідрогеназна активність, мкмоль NADH/хв/мг протеїну	0,37±0,03	0,51±0,03*	0,53±0,04*
Глюкозо-6-фосфатазна активність, мкмоль NADH/хв/мг протеїну	0,25±0,01	0,37±0,02*	0,45±0,02*
Мітохондріальна фракція			
Ізоцитратдегідрогеназна активність, мкмоль NADPH/хв/мг протеїну	0,028±0,001	0,050±0,004*	0,063±0,003*
Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність, мкмоль NADH/хв/мг протеїну	0,10±0,007	0,19±0,011*	0,22±0,012*

Примітка. *Достовірна різниця ($p \leq 0,05$), порівнюючи з контролем

Встановлено підвищення глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності у 1,9 рази у мітохондріальній фракції гепатопанкреаса риб першої дослідної групи та у 2,2 рази другої дослідної групи, порівнюючи з контролем (табл. 3.11). Ці зміни ймовірно є наслідком впливу 19-нортестостерону на початкові стадії процесу анаеробного окиснення глюкози. Крім цього у коропів першої та другої дослідних груп 19-нортестостерон активує ізоцитратдегідрогеназну активність у мітохондріальній фракції гомогенату гепатопанкреаса, значення якої зросло

відповідно у 1,79 і 2,25 рази, порівнюючи з контролем (табл. 3.11). Враховуючи те, що ізоцитратдегідрогеназа є одним із ключових ферментів циклу трикарбонових кислот, підвищення її активності в мітохондріях гепатопанкреаса риб дослідних груп вказує на стимуляцію стероїдними гормонами енергетичних процесів.

Отже, зростання активності низки ензимів вуглеводного та енергетичного обміну, а також переамінування глікогенних амінокислот у гепатопанкреасі риб під впливом 19-нортестостерону розкриває один із важливих аспектів механізму його впливу на процеси метаболізму в тканинах кісткових риб, що забезпечує їх адаптацію до дії стероїдних гормонів.

3.5. Фракційний склад білків плазми крові за дії 19-нортестостерону

Дослідженнями встановлено, що плазма крові коропа містить значну кількість протеїнів молекулярна маса яких змінюється від 16 до 284 кДа і більше (табл. 3.12). Найбільшу кількість у плазмі крові риб становлять білки з молекулярною масою 17–16, 29–27, 228–220, 240–231 і 266–244 кДа. Деяко менше білків у плазмі крові риб з молекулярною масою 284–275, 62–58, 57–56, 55–53 і 52–51 кДа, тоді як вміст протеїнів інших фракцій значно нижчий.

Таблиця 3.12

Фракційний склад білків плазми крові риб за дії 19-нортестостерону,

%, $M \pm m$, $n=5$

Фракція білка	Молекулярна маса, кДа	Контрольна група	Дослідні групи	
			перша	друга
1	2	3	4	5
A	284–275	4,12±0,35	4,34±0,47	–
B	266–244	7,95±1,18	5,71±1,43	9,64±1,46
C	240–231-	4,16±0,85	9,48±1,48*	12,10±2,28*
D	228–220-	–	15,60±1,60	4,57±0,92**
E	215–179-	2,41±0,07	6,32±0,77*	6,45±1,17*

Продовження таблиці 3.12

1	2	3	4	5
F	169–146	0,64±0,11	1,54±0,42*	0,61±0,19**
G	134–124	0,32±0,05	0,53±0,08	0,27±0,10
H	116–105-	–	0,56±0,18	0,69±0,18
J	104–95-	0,61±0,12	1,41±0,18*	0,78±0,21**
K	84–73-	1,03±0,40	0,77±0,17	0,53±0,12
L	62–58	4,46±0,65	3,98±1,21	4,00±0,31
M	57–56	7,64±1,52	4,78±1,04	6,07±1,08
N	55–53	4,73±0,43	5,50±0,86	3,64±1,04
O	52–50	2,74±0,43	3,83±0,40	2,83±0,66
P	48–44	–	0,26±0,04	1,19±0,12**
Q	42–41	0,65±0,06	0,68±0,26	–
R	38–36	1,37±0,18	1,07±0,34	–
S	35–33	3,87±0,35	0,81±0,27*	0,53±0,09*
T	29–27	35,97±2,91	33,07±1,32	30,48±4,67
U	24–20	0,49±0,12	0,42±0,09	–
V	17–16	14,14±0,69	12,79±1,13	12,51±1,35

Примітка. *Достовірна різниця ($p \leq 0,05$), порівнюючи з контролем, **порівнюючи з даними у риб першої групи

Показано, що синтетичний стероїд 19-нортестостерон у досліджуваній концентрації навіть за нетривалого впливу на риб змінював фракційний склад білків плазми крові. У плазмі крові коропів першої дослідної групи, які знаходились у воді з концентрацією 19-нортестостерону 50 мкг/дм³ упродовж 24 годин, рівень білків з молекулярною масою 240–231 кДа підвищився у 2,28 рази, 215–179 кДа – у 2,62 рази, 169–146 кДа – у 2,41 рази і 104–95 кДа – у 2,31 рази (табл. 3.12). Вміст білків з молекулярною масою 35–33 кДа навпаки знизився у 4,78 рази, а інших фракцій не змінювався.

Крім того у плазмі крові риб першої дослідної групи виявлено фракції білків з молекулярною масою 228–220, 116–105 і 48–44 кДа, які були відсутні у коропів контрольної групи. На підставі одержаних результатів можна зробити висновок про те, що 19-нортестостерон впливає не тільки на біосинтез білків у гепатопанкреасі але й змінює електрофоретичну рухливість білків плазми крові риб.

Підвищення концентрації стероїдного гормону 19-нортестостерону у воді до 200 мкг/дм³, в якій утримували коропів другої дослідної групи, також змінювало фракційний склад білків плазми крові. У плазмі крові риб встановлено вищий у 2,91 рази вміст білків з молекулярною масою 240–231 кДа, у 2,68 рази – 215–179 кДа і нижчий у 7,31 рази рівень протеїнів з молекулярною масою 35–33 кДа, порівнюючи з контролем (табл. 3.13). Виявлено певні відмінності у фракційному складі білків плазми крові у риб першої та другої дослідних груп. У плазмі крові риб другої дослідної групи, порівнюючи з першою, вміст білків з молекулярною масою 228–220 кДа знизився у 3,41 рази, 169–146 кДа – у 2,52 рази, 104–95 кДа – у 1,81 рази, але підвищився у 4,58 рази рівень білків з молекулярною масою 48–44 кДа. Крім того у плазмі крові риб другої дослідної групи, порівнюючи з першою, не було виявлено окремих фракцій протеїнів з молекулярною масою 169–146, 104–95 і 48–44 кДа, що ймовірно є наслідком впливу високої концентрації 19-нортестостерону на електрофоретичну рухливість протеїнів.

Отже, отримані результати дозволяють зробити висновок, що синтетичний стероїд 19-нортестостерон не тільки проявляє у риб анаболічний ефект, але й впливає на фракційний склад білків плазми крові, змінюючи їх електрофоретичну рухливість.

Одержані результати досліджень розкривають важливі аспекти впливу синтетичного стероїдного гормону 19-нортестостерону на біосинтез протеїнів у тканинах та їх властивості у плазмі крові кісткових риб.

3.6. Особливості метаболічних процесів у тканинах риб за тривалого впливу 19-нортестостерону

Встановлено, що за концентрації гормону нандролону у воді 50 мкг/дм³ у плазмі крові риб зріс у 2,51 рази рівень кальцію, а також у 3,60 рази лактатдегідрогеназна активність, тоді як креатинфосфокіназна і гамаглутамілтрансферазна активності навпаки зменшилась відповідно у 1,96 і 1,88 рази, порівнюючи з контролем (табл. 3.13).

Таблиця 3.13

Вміст метаболітів обміну вуглеводів, ліпідів, активність ензимів та кількість макроелементів у плазмі крові риб за довготривалої дії 19-нортестостерону, $M \pm m$, $n=6$

Показник	Контрольна група	Дослідні групи	
		перша	друга
1	2	3	4
Глюкоза, ммоль/дм ³	4,99±0,44	5,48±1,22	5,17±0,69
Білок, г/дм ³	20,94±1,33	23,90±2,92	16,98±1,37
Тригліцериди, ммоль/дм ³	1,01±0,99	1,16±0,24	1,33±0,37
Холестерол, ммоль/дм ³	2,94±0,24	3,25±0,30	2,76±0,31
Сечовина, ммоль/дм ³	0,78±0,24	1,10±0,41	0,66±0,13
Креатинін, мкмоль/дм ³	26,17±5,37	18,58±2,65	19,44±1,03
Лактатдегідрогеназна активність, Uм/л	0,49±0,03	1,79±0,13*	2,08±0,68*
Аланінамінотрансферазна активність, U/л	12,50±1,81	11,68±2,24	27,62±8,88*
Аспартатамінотрансферазна активність, U/л	221,12±42,26	170,40±23,77	117,83±25,88***
Кальцій, ммоль/дм ³	2,22±0,47	5,58±0,58*	2,02±0,26**
Фосфор неорг., ммоль/дм ³	1,62±0,13	1,86±0,31	1,61±0,17

Продовження таблиці 3.13

1	2	3	4
Креатинфосфокіназна активність, U/ml	8,11±2,21	4,14±0,94*	12,06±0,99**

Примітка. *Достовірна різниця ($p < 0,05$), порівнюючи з контролем, **порівнюючи з даними у риб першої групи

Водночас більшість інших показників обміну вуглеводів, ліпідів, амінокислот, протеїнів, а саме: концентрація глюкози, тригліцеридів, холестеролу, сечовини, креатиніну, неорганічного фосфору, загального білка, аланінамінотрансферазна і аспартатамінотрансферазна активності, вміст тестостерону і прогестерону, не змінювались, порівнюючи з контролем (табл. 3.13; 3.14).

Таблиця 3.14

Вплив довготривалої дії 19-нортестостерону на вміст гормонів у плазмі крові риб, $M \pm m$, $n=6$

Показник	Контрольна група	Дослідні групи	
		перша	друга
Тестостерон, нг/мл	0,46±0,05	0,41±0,04	0,61±0,03***
Прогестерон, нг/мл	0,22±0,05	0,22±0,08	0,13±0,03***
Кортизол, мкг/л	18,14±1,89	12,62±0,47	8,08±1,40*

Примітка. *Достовірна різниця ($p \leq 0,05$), порівнюючи з контролем, **порівнюючи з першою групою

Встановлено зниження концентрації глюкокортикоїдного гормону кортизолу в плазмі крові риб першої дослідної групи у 1,44 рази, порівнюючи з його вмістом у риб контрольної групи, який впливає на процес гліюконеогенезу в гепатопанкреасі.

Підвищення концентрації нандролону у воді у 4 рази, тобто до 200 мкг/дм³, впливало на вміст метаболітів обміну вуглеводів, ліпідів, амінокислот

та активність ензимів, а також рівень стероїдних гормонів у плазмі крові риб значно більшою мірою.

Показано, що у плазмі крові риб другої дослідної групи, порівнюючи з контролем, зросла концентрація тестостерону у 1,33 рази, а також у 4,24 рази – лактатдегідрогеназна активність, у 2,21 рази – аланінамінотрансферазна, але знизилась у 2,33 рази гамаглутамілтрансферазна активність (табл. 3.13, 3.14). Водночас у плазмі крові риб другої дослідної групи знизився у 1,69 рази рівень прогестерону і у 2,24 рази кортизолу, а аспартатамінотрансферазна активність зменшилась у 1,88 рази, порівнюючи з контролем. Вміст глюкози, загального білка, тригліцеридів, холестеролу, креатиніну, сечовини, кальцію, неорганічного фосфору і креатинфосфокіназна активність у плазмі крові риб другої дослідної групи, порівнюючи з аналогічними даними коропів контрольної групи, не змінювались (табл. 3.13).

Виявлено також певні відмінності щодо вмісту досліджуваних метаболітів у плазми крові у риб другої дослідної групи, порівнюючи з першою групою. У плазмі крові риб другої дослідної групи аспартатамінотрансферазна активність знизилась у 1,45 рази, вміст кальцію – у 2,76 рази, за одночасного підвищення у 2,91 рази креатинфосфокіназної і у 2,36 рази аланінамінотрансферазної активностей, порівнюючи з аналогічними показниками у риб першої дослідної групи (табл. 3.13). Інші досліджувані показники у риб першої і дослідної груп не відрізнялись між собою.

Отже, на основі проведених досліджень можна зробити висновок про те, що за довготривалого впливу дія синтетичних стероїдних гормонів, зокрема 19-нонтестостерону, направлена на синтез ендогенних гормонів в інтерреналових клітинах нирок риб, що викликає зміну їх рівня в крові та метаболізму вуглеводів, ліпідів, амінокислот у тканинах. Характер цих змін в організмі риб залежить від концентрації цього ксенобіотика у воді. Вказаний висновок також підтверджено дослідженнями вмісту окремих метаболітів та активності ензимів і гормонів у гепатопанкреасі риб, яких утримували в акваріумах з різною концентрацією 19-нортестостерону.

Встановлено, що у гепатопанкреасі риб, які знаходились у воді з концентрацією нандролону 50 мкг/дм^3 , рівень глюкози підвищився у 3,0 рази, загального білка – у 3,4 рази, лактатдегідрогеназна активність зросла у 1,96 рази, креатинфосфокіназна активність знизилась у 1,45 рази, тоді як вміст холестеролу, тригліцеридів, сечовини, креатиніну, аланінамінотрансферазна та аспартатамінотрансферазна активності, а також рівень кальцію і неорганічного фосфору не відрізнялись від аналогічних показників у коропів контрольної групи (табл. 3.15).

Таблиця 3.15

**Вміст метаболітів обміну вуглеводів, ліпідів, білків і макроелементів
та ензимна активність у гепатопанкреасі риб за довготривалої дії
19-нортестостерону, $M \pm m$, $n=6$**

Показник	Контрольна група	Дослідні групи	
		перша	друга
1	2	3	4
Глюкоза, мкмоль/г	$19,09 \pm 2,36$	$58,18 \pm 6,55^*$	$274,00 \pm 26,27^*$
Білок, мг/г	$44,91 \pm 2,64$	$154,09 \pm 2,24^*$	$124,73 \pm 14,09^*$
Тригліцериди, мкмоль/г	$5,91 \pm 1,82$	$9,45 \pm 1,73$	$11,64 \pm 4,36^*$
Холестерол, мкмоль/г	$9,91 \pm 1,09$	$10,45 \pm 1,73$	$11,73 \pm 1,64$
Сечовина, мкмоль/г	$37,24 \pm 5,82$	$29,45 \pm 7,64$	$25,27 \pm 5,73$
Креатинін, нмоль/г	$22,43 \pm 3,30$	$18,04 \pm 2,03$	$34,17 \pm 6,43^{**}$
Кальцій, мкмоль/г	$4,00 \pm 0,55$	$3,55 \pm 0,36$	$4,36 \pm 0,82$
Фосфор (неорг), мкмоль/г	$37,91 \pm 2,55$	$34,27 \pm 5,09$	$52,00 \pm 6,00^{**}$
Лактатдегідрогеназна активність, ммоль НАДН/хв/л	$6,83 \pm 0,62$	$13,37 \pm 0,91^*$	$5,45 \pm 0,73$
Аланінамінотрансферазна активність, ммоль НАДН/хв/л	$1,78 \pm 0,63$	$2,16 \pm 0,35$	$4,76 \pm 0,12^{*.*.}$

Продовження таблиці 3.15

1	2	3	4
Аспаратамінотрансферазна активність, ммоль НАДН/хв/л	4,17±0,32	4,90±0,31	5,94±0,09*
Креатинфосфокіназна активність, ммоль НАДФ ⁺ /хв/л	2,15±0,61	1,48±0,11*	0,41±0,02***

Примітка. *Достовірна різниця ($p \leq 0,05$), порівнюючи з контролем, **порівнюючи з першою групою

Найбільш суттєві зміни метаболічних процесів у гепатопанкреасі риб виявлено за концентрації гормону 19-нортестостерону у воді 200 мкг/дм³ (табл. 3.15). Показано, що концентрація глюкози у гепатопанкреасі риб цієї дослідної групи збільшилась у 14,42 рази, білка – у 2,78 рази, тригліцеридів – у 1,97 рази, аланінамінотрансферазна активність збільшилась у 2,67 рази, аспаратамінотрансферазна активність – у 1,43 рази, значно знизилась креатинфосфокіназна активність – у 5,24 рази, водночас лактатдегідрогеназна активність, вміст кальцію і фосфору не змінювались, порівнюючи з контролем.

Не виявлено відмінностей і між вмістом тестостерону та прогестерону в гепатопанкреасі риб, які перебували у воді з концентрацією нандролону 50 мкг/дм³, порівнюючи з контролем. Однак рівень кортизолу в гепатопанкреасі риб першої дослідної групи, порівнюючи з контролем, зріз у 3,98 рази (табл. 3.16).

Порівнюючи з контрольною групою риб, концентрація тестостерону у гепатопанкреасі коропів, яких утримували у воді з рівнем нандролону 200 мкг/дм³, зросла у 10,22 рази, прогестерону – у 2,73 рази, а кортизолу – у 3,43 рази.

Таблиця 3.16

**Вплив довготривалої дії 19-нортестостерону на вміст гормонів
у гепатопанкреасі риб, $M \pm m$, $n=6$**

Показник	Контрольна група	Дослідні групи	
		перша	друга
Тестостерон, нг/г тканини	7,21±0,37	8,13±0,45	73,62±4,33*.*.*
Прогестерон, нг/г тканини	1,50±0,34	1,33±0,26	4,15±0,67*.*.*
Кортизол, мкг/дл гомогенату	1,56±0,28	5,57±0,24*	5,36±0,34*

Примітка. *Достовірна різниця ($p \leq 0,05$), порівнюючи з контролем, **порівнюючи з першою групою

Слід зазначити, що виявлено значні відмінності між досліджуваними показниками обміну речовин у гепатопанкреасі риб, які утримувались у воді з різною концентрацією 19-нортестостерону, а саме – 50 і 200 мкг/дм³. За більш високої концентрації стероїду у воді (200 мкг/дм³), порівнюючи з більш низькою, у гепатопанкреасі риб збільшилась концентрація глюкози – у 9,72 рази, креатиніну – у 1,9 рази, неорганічного фосфору у 1,52 рази, аланінамінотрансферазна активність зросла у 2,21 рази, креатинфосфокіназна – у 3,61 рази, а вміст протеїнів, тригліцеридів, сечовини і кальцію не змінювався (табл. 3.15).

Важливо відмітити, що у гепатопанкреасі риб другої дослідної групи більшою мірою, порівнюючи з рибами першої групи, у гепатопанкреасі збільшилась концентрація тестостерону – у 9,09 рази, прогестерону – у 3,15 рази, а кортизолу не змінювалась (табл. 3.16).

Отже, підвищення концентрації нандролону у воді акваріума до 200 мкг/дм³ суттєво впливає не тільки на основні метаболічні процеси, зокрема обмін вуглеводів, ліпідів, амінокислот та активність низки ензимів у тканинах але й змінює гормональний статус в організмі риб.

Отже, на підставі проведених експериментів та одержаних результатів можна зробити висновок про те, що екзогенні стероїдні гормони, зокрема 19-нортестостерон, потрапляючи в організм кісткових риб, змінюють їх гормональний статус, внаслідок чого активуються реакції гліюконеогенезу, енергетичного обміну, окисно-відновні процеси, біосинтез білків та змінюється їх електрофоретична рухливість, які залежать від концентрації стероїдів у воді і тривалості впливу.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вплив різних за походженням, властивостями та хімічним складом ксенобіотиків на рибу залежить від їх концентрації у воді, тривалості дії, а також токсичних властивостей і характеризується активацією адаптаційних механізмів, а за тривалої дії – порушенням фізіологічних функцій, енергетичних процесів, дисбалансом гормонів та зміною активності низки ензимів у тканинах [1, 4, 5, 17, 19, 148]. Важиву роль у механізмах адаптації гідробіонтів до зміни умов існування у водному середовищі відіграють стероїдні гормони – регулятори внутрішньоклітинного метаболізму [19, 148]. У кісткових риб стероїдні гормони регулюють біологічні функції та метаболічні процеси в тканинах [76, 94]. Крім того вони впливають на значну кількість ферментативних реакцій, які забезпечують перебіг окремих ланок метаболізму, що лежать в основі адаптації гідробіонтів до забруднювачів води [13, 49, 76, 94]. Встановлено регулюючу роль кортикотропного гормону кортизолу в глюконеогенезі, енергетичному обміні [27, 94], а статевих стероїдів тестостерону і прогестерону – в біосинтезі білків м'язової тканини [30], метаболізмі глюкози, ліпідів, амінокислот у гепатопанкреасі кісткових риб [8, 9, 12, 27]. Детально досліджено їх вплив на основні ланки утворення антитіл в імунокомпетентних органах риб [49]. Концентрація стероїдних гормонів у тканинах кісткових риб залежить від виду, віку, статі, сезону року та низки екзогенних та ендогенних факторів [17, 56, 94]. В основі механізму дії стероїдних гормонів лежить їхня здатність впливати на концентрацію внутрішньоклітинних месенджерів та процеси транскрипції, змінюючи у такий спосіб вміст та активність ензимів у клітинах органів-мішеней [94, 117, 140]. На вміст ендогенних стероїдів у тканинах кісткових риб також впливають їх синтетичні аналоги, які володіють метаболічним ефектом [9, 12, 13, 16].

Беручи до уваги наведені результати щодо регуляторної ролі ендогенних стероїдів в організмі кісткових риб, слід було очікувати, що витримування коропів

у воді з їх синтетичними аналогами, зокрема 19-нортестостероном, впливатиме на фізіологічні функції, вміст ендогенних стероїдів, ПОЛ, метаболізм вуглеводів, ліпідів, амінокислот, активність ензимів та біосинтез білків у тканинах.

Встановлено посилення дихальної функції у коропів за концентрації синтетичного стероїду у воді 200 мкг/дм³ навіть за його нетривалого впливу, тоді як за незначного вмісту частота дихання у риб впродовж 24 годин експерименту не змінювалась (табл. 3.1). Цей показник не змінювався на початку експерименту і залишався на рівні контролю в перші три години пливу 19-нортестостерону на дихальну функцію риб, яких витримували у воді з концентрацією гормону 50 і 200 мкг/м³. Відсутність змін дихальних рухів у коропів другої дослідної групи на початку експерименту і збільшення їх кількості через 3, 12 та 24 години в середньому до 28–31 раза за хвилину, не дивлячись на відсутність різниці у концентрації кисню у воді, зумовлено посиленням окисно-відновних процесів у тканинах. Збільшення кількості дихальних рухів у риб за високої дози синтетичного стероїду у воді є ймовірно одним із механізмів, що забезпечують активацію реакцій гліюконеогенезу, енергетичного обміну та біосинтезу протеїнів плазми крові в гепатопанкреасі [94, 148]. На основі одержаних результатів можна зробити висновок про здатність синтетичних стероїдних гормонів проникати із води через зябра в організм риб, шляхом їх взаємодії із специфічними рецепторами білкової природи, накопичуватись у різних органах, викликаючи суттєві зміни структури, функцій та метаболічних процесів [9, 147].

Відсутність змін живої ваги коропів, а також промірів та покривів тіла, стану очей, грудних, черевних, спинного, анального та хвостового плавців під впливом 19-нортестостерону ймовірно пов'язано з незначною концентрацією стероїду у воді і нетривалою дією на риб (табл. 3.2). За досліджуваної концентрації у воді 19-нортестостерон не впливав на масу та індекс гепатопанкреаса і селезінки риб дослідних груп, порівнюючи з контролем, які можуть змінюватися за забруднення води ксенобіотиками [7]. Відомо, що селезінка у риб є основним кровотворним органом, а зміна її функціонального стану впливає на гематологічні показники [3, 6]. Не дивлячись на те, що за високої концентрації у воді синтетичні стероїди

впливають на кровотворні органи риб [6], проведеними експериментами не виявлено зміни показників морфологічного складу крові коропів дослідних груп за концентрації 19-нортестостерону у воді 50 і 200 мкг/дм³ (табл. 3.3). Одержані результати вказують на дозозалежний вплив синтетичних стероїдів, що потрапляють у природні водойми на функціональний стан кровотворних органів у риб. Концентрація гемоглобіну, кількість еритроцитів, лейкоцитів, еозинофілів, нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів у крові риб дослідних груп не відрізнялась від контролю (табл. 3.3). Однак за концентрації 200 мкг/дм³ швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ) в крові риб зменшилась у 1,87 рази, тоді як інші показники морфологічного складу крові не змінювались. Вказані зміни показника ШОЕ можуть бути наслідком підвищення кількості альбумінів та зміни співвідношення інших фракцій білків у плазмі крові риб під впливом 19-нортестостерону (табл. 3.12).

Вплив 19-нортестостерону на метаболізм у тканинах риб проявлявся зміною гормонального стану, ПОЛ та активності ензимів антиоксидантного захисту в гепатопанкреасі і плазмі крові. Вказані зміни ймовірно є не тільки результатом безпосереднього впливу досліджуваного синтетичного стероїду на вищевказані процеси в тканинах. Вміст ендогенних стероїдних гормонів у гепатопанкреасі риб особливо змінюється за підвищеного рівня 19-нортестостерону у воді (табл. 3.4). Необхідно відмітити, що за концентрації у воді 50 мкг/дм³ і нетривалої дії 19-нортестостерон не впливав на вміст кортизолу, тестостерону і нортестостерону в плазмі крові та гепатопанкреасі риб. За цієї концентрації 19-нортестостерону у воді вміст глюкози, тригліцеридів, креатиніну і кальцію в тканинах коропів не змінювався та не відрізнявся від контролю, що корелює із даними щодо вмісту кортизолу в тканинах (табл. 3.7, 3.8). Одержані результати свідчать ймовірно про наявність у кісткових риб розвинутих пристосувальних механізмів до дії низької концентрації синтетичних стероїдів на рівні не тільки фізіологічних функцій але й метаболічних процесів у тканинах. Збільшення концентрації 19-нортестостерону у воді до 200 мкг/дм³, навіть за нетривалої дії, підвищувало вміст тестостерону, прогестерону і кортизолу в гепатопанкреасі коропів, а також

рівень тестостерону в плазмі крові, знижувало вміст прогестерону і кортизолу, що впливало на вміст глюкози, білків, активність ензимів обміну вуглеводів у тканинах риб.

Отже, за високої концентрації у воді синтетичні стероїди змінюють гормональний стан в організмі риб, що впливає значною мірою на досліджувані ланки метаболічних процесів у тканинах. На вплив синтетичних стероїдів на гормональний статус у кісткових риб також вказують результати досліджень інших авторів [94, 117].

В експериментах встановлено вплив 19-нортестостерону на перекисне окиснення ліпідів та систему антиоксидантного захисту у коропів дослідних груп. Не дивлячись на незначну концентрацію 19-нортестостерону у воді і його нетривалу дію, в плазмі крові коропів підвищувався вміст МДА, дієнових кон'югатів, а рівень гідроперекисів ліпідів не змінювався, що свідчить про активацію ПОЛ в тканинах (табл. 3.5). Цей висновок узгоджується з результатами досліджень продуктів ПОЛ в плазмі крові коропів другої дослідної групи, які перебували у воді з концентрацією 19-нортестостерону 200 мкг/дм³. Вміст МДА, дієнових кон'югатів, каталазна і СОД активності у плазмі крові риб виявились вищими, порівнюючи з контролем. На активацію 19-нортестостероном у тканинах риб ензимів системи антиоксидантного захисту вказує підвищення каталазної і СОД активності в плазмі крові риб дослідних груп (табл. 3.5). Однак в експерименті не виявлено різниці між вказаними показниками у риб першої і другої дослідних груп, не дивлячись на значне підвищення концентрації 19-нортестостерону у воді. Встановлені зміни концентрації МДА і дієнових кон'югатів у плазмі крові риб дослідних груп можна пояснити стимулюючим впливом 19-нортестостерону на процеси оксидоредукції, що веде до утворення активних форм кисню та гідроперекисів ліпідів у гепатопанкреасі риб, що викликає посилення реакцій антиоксидантного захисту, в яких головна роль належить каталазі, СОД та ензимам перетворення глутатіону (табл. 3.6).

Підвищення концентрації МДА і дієнових кон'югатів у надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб першої дослідної групи відбулось внаслідок

впливу 19-нортестостерону на утворення активних форм кисню, підвищення вмісту гідроперекисів ліпідів, з яких утворюються вищезазначені метаболіти (табл. 3.6). Збільшення вмісту дієнових кон'югатів у надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса ймовірно є наслідком підвищення каталазної і СОД активності, що свідчить про посилення процесів ПОЛ в тканинах риб дослідних груп. Концентрація МДА, дієнових кон'югатів, каталазна і СОД активності надосадової фракції гомогенату гепатопанкреаса коропів другої дослідної групи виявилась також вищою, що підтверджує зроблений висновок про активацію ПОЛ та реакцій антиоксидантного захисту в організмі риб. На відміну від плазми крові, за підвищення концентрації 19-нортестостерону у воді до 200 мкг/дм³, спостерігалось подальше збільшення вмісту дієнових кон'югатів і СОД активності в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб другої дослідної групи, не дивлячись на те, що за вмістом МДА і каталазною активністю відмінностей не виявлено. Підвищення концентрації МДА, що утворюється із гідропероксидів ліпідів, вміст якого зростає в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб під впливом синтетичного стероїду, відбулося ймовірно внаслідок зміни активності ензимів енергетичного обміну [18]. Вказаний висновок доведено подальшими дослідженнями ензимної активності різних фракцій гомогенату гепатопанкреаса риб дослідних груп за дії 19-нортестостерону.

Експериментами встановлено, що синтетичні стероїди проявляють в організмі кісткових риб анаболічний ефект. На це вказує збільшення в плазмі крові риб дослідних груп під дією 19-нортестостерону концентрації загального білка та вмісту альбумінів основної фракції крові, які синтезуються в гепатопанкреасі риб (табл. 3.7, 3.8). Відомо, що основними субстратами для синтезу протеїнів у тканинах є амінокислоти аланін та аспарагінова кислота, на перетворення яких впливає 19-нортестостерон, змінюючи аланінамінотрансферазну і аспартатамінотрансферазну активності в надосадовій рідині гепатопанкреаса риб дослідних груп (табл. 3.10). Крім цього аланін та аспарагінова кислота, будучи глюкогенними амінокислотами перетворюються

в глюкозу в реакціях глюконеогенезу, виступають важливими джерелами не тільки вуглеводів, але й енергії у кісткових риб. Підвищуючи аланінамінотрансферазну і аспартатамінотрансферазну активності в гепатопанкреасі риб, синтетичні стероїди, крім стимуляції реакцій переамінування амінокислот, впливають на обмін вуглеводів, ліпідів, окремих мінеральних сполук, вміст яких в гепатопанкреасі риб дослідних груп залежав від концентрації 19-нортестостерону у воді (табл. 3.7–3.11). Біосинтез білків у тканинах – складний багатоступеневий процес, на який впливає велика кількість факторів. Він потребує значних затрат енергії, джерелом якої є вуглеводи, ліпіди, амінокислоти, які окислюються до CO_2 і H_2O [35]. Ендогенні стероїди, як і їх екзогенні аналоги, активують ферментні системи перетворення вуглеводів, ліпідів і амінокислот, змінюють вміст внутрішньоклітинних посередників та впливають на процеси транскрипції, стимулюючи біосинтез протеїнів у тканинах [35].

До низької концентрації 19-нортестостерону у воді та його нетривалої дії коропа легко адаптуються, змінюючи лише окремі реакції обміну вуглеводів, ліпідів та амінокислот, а також активність ензимів у гепатопанкреасі та плазмі крові (табл. 3.7, 3.8). У риб 19-нортестостерон, будучи синтетичним аналогом тестостерону, за концентрації у воді 50 мкг/дм^3 , стимулював процес глюконеогенезу, синтез ліпідів, гідроліз креатинфосфату, на що вказує підвищення вмісту глюкози, тригліцеридів, креатиніну, неорганічного фосфору в гепатопанкреасі коропів, не дивлячись на те, що рівень ендогенних стероїдів не змінювався (табл. 3.8). Вміст глюкози, неорганічного фосфору та заліза в плазмі крові риб дослідних груп знижувався, а тригліцеридів і креатиніну не відрізнявся від контролю. У плазмі крові риб першої дослідної групи під впливом 19-нортестостерону встановлено підвищення креатинфосфокіназної і аспартатамінотрансферазної активностей, зменшення лужнофосфатазної і аланінамінотрансферазної активностей за сталих значень лактатдегідрогеназної активності (табл. 3.9). Підвищення креатинфосфокіназної активності в плазмі крові, яка контролює вміст АТФ в м'язах, може вказувати на збільшення потреби

організму риб в енергії, за їх адаптації до дії синтетичних стероїдів. Зменшення концентрації неорганічного фосфору у плазмі крові риб, порівнюючи з контролем, корелює із зниженням активності лужної фосфатази і пов'язане, ймовірно, з впливом 19-нортестостерону на синтез макроергічних сполук, а зменшення вмісту заліза в плазмі крові – із його накопиченням в тканинах. Можливо одним із шляхів його впливу на активність ензимів у кісткових риб є утворення в клітинах органів-мішеней гормон-рецепторних комплексів, які регулюють транскрипцію відповідних генів, контролюючи так синтез та активність ензимів [117].

За концентрації 19-нортестостерону у воді до 200 мкг/дм³ вміст глюкози, тригліцеридів, креатиніну і ензимна активність у тканинах збільшувалися, порівнюючи з умовами більш низького рівня гормону у воді. Ймовірно це є наслідком його впливу на процеси стероїдогенезу в інтерреналових клітинах нирок коропів, про що свідчить підвищення концентрації ендогенних стероїдів кортизолу і тестостерону в плазмі крові та гепатопанкреасі (табл. 3.4). Відомо, що у кісткових риб кортизол стимулює гліюконеогенез у гепатопанкреасі, одночасно знижуючи окислення глюкози в м'язах, що викликає зростання її концентрації в крові. Зміна рівня кортизолу в тканинах риб під дією синтетичних стероїдів, а також за забруднення природних водойм хімічними речовинами або за дії різних стрес-факторів, впливатиме на гліюконеогенез [19, 22, 94, 117]. У риб кортизол впливає на утворення та використання енергії, регуляцію гомеостазу, забезпечення адаптації риб до різних ксенобіотиків води [22, 94]. Встановлене підвищення концентрації глюкози в гепатопанкреасі риб другої дослідної групи є наслідком стимулюючого впливу 19-нортестостерону на гліюконеогенез, внаслідок зростання вмісту кортизолу і тестостерону (табл. 3.8). З іншого боку зниження вмісту глюкози в плазмі крові риб дослідних груп є ймовірно наслідком її використання як джерела енергії в інших тканинах, зокрема в м'язах. Важливим джерелом енергії у кісткових риб, крім глюкози, є також тригліцериди, концентрація яких у гепатопанкреасі риб дослідних груп під впливом 19-нортестостерону збільшувалась, а в плазмі крові не змінювалась, порівнюючи

з контролем (табл. 3.8). Отже, важливим фактором впливу синтетичних стероїдів на метаболізм у кісткових риб є зміна концентрації ендогенних стероїдних гормонів у тканинах, зокрема кортизолу, тестостерону і прогестерону, що підтверджено результатами досліджень інших авторів [73, 117]. Не виключено, що 19-нортестостерон у кісткових риб здатний конкурувати з прогестероном і особливо з тестостероном за рецептори зв'язування в цитоплазмі, або ж проявляти свій вплив на пострецепторному рівні дії стероїдів, що викликає підвищення концентрації останніх у гепатопанкреасі, які стимулюють глюконеогенез та синтез ліпідів. Відомо, що ін'єкція кістковим риbam прогестерону змінює вміст 11-кетотестостерону в тканинах, як і за введення тестостерону [43]. Отже, зміна концентрації глюкози, тригліцеридів, креатиніну, неорганічного фосфору в гепатопанкреасі риб дослідних груп є наслідком впливу стероїдних гормонів на метаболізм вуглеводів, ліпідів та мінеральних речовин.

На основі одержаних результатів можна зробити висновок про вплив синтетичного стероїдного гормону 19-нортестостерону на глюконеогенез, обмін ліпідів та фосфоровмісних сполук. У зв'язку з чим необхідно зазначити, що основним у механізмі впливу стероїдних гормонів на обмін вуглеводів, протеїнів, ліпідів та амінокислот є зміна кількості і активності ензимів, що підтверджено проведеними дослідженнями.

Встановлено збільшення лактатдегідрогеназної активності в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса у риб першої дослідної групи, порівнюючи з контролем (табл. 3.10). Оскільки ензим каталізує зворотню реакцію перетворення пірувату в лактат за участю NADH, зміна його активності свідчить про вплив 19-нортестостерону не тільки на редокс-потенціал клітин гепатопанкреаса, але і активацію реакцій анаеробного окиснення глюкози в тканинах. Відомо, що стероїдні гормони у риб підвищують активність ферментів глюконеогенезу в печінці, одночасно стимулюючи окиснення глюкози в м'язах [94, 117].

Підвищення аланінамінотрансферазної і аспартатамінотрансферазної активностей у надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб дослідних

груп, свідчить про посилення використання аланіну і аспартату як субстратів під час синтезу глюкози (табл. 3.10). Збільшення креатинфосфокіназної активності в надосадовій фракції гепатопанкреаса коропів дослідних груп, зважаючи на роль цього ензиму в обміні макроергів в м'язах риб, пов'язано ймовірно з активацією синтетичними стероїдами енергетичного обміну в тканинах. Це може бути відповіддю метаболізму на збільшення потреби в енергетичних ресурсах під час адаптації риб до дії синтетичних стероїдів у воді. Показано, що 19-нортестостерон стимулював лужнофосфатазну активність у надосадовій рідині гомогенату гепатопанкреаса у риб дослідних груп, що можна пояснити збільшенням потреби тканин у неорганічному фосфорі, необхідного для синтезу АТФ. Значні зміни лужнофосфатазної активності в гепатопанкреасі риб за впливу 19-нортестостерону можуть бути одним із критеріїв біотестування природних водойм за їх забруднення синтетичними стероїдами. Водночас слід відмітити, що за концентрації 19-нортестостерону у воді 200 мкг/дм³ лужнофосфатазна активність у гепатопанкреасі риб другої дослідної групи, порівнюючи з першою, виявилась нижчою, що свідчить про гальмуючий вплив високих концентрацій стероїдних гормонів на процеси перетворення фосфорорганічних сполук у тканинах гідробіонтів.

Дослідження активності низки ензимів у субклітинних фракціях гепатопанкреаса риб підтвердило висновок щодо стимуляції синтетичними стероїдами глюконеогенезу, а також окисно-відновних та енергетичних процесів у тканинах. Підвищення лактатдегідрогеназної активності в супернатанті гомогенату гепатопанкреаса коропів дослідних груп корелює із результатами досліджень активності вказаного ензиму в надосадовій фракції і свідчить про вплив синтетичних стероїдів на активність НАД-залежних дегідрогеназ та співвідношення нікотинамідних коферментів у цитоплазмі гепатоцитів (табл. 3.11). На вплив синтетичних стероїдів на НАДФ-залежні ферментні системи в тканинах риб дослідних груп вказує активація ізоцитратдегідрогеназної активності в мітохондріальній фракції гомогенату гепатопанкреаса (табл. 3.11). Цей ензим каталізує реакцію окиснювального декарбоксилювання перетворення

ізоцитрату в альфа-кетоглутарат за участю НАДФ⁺. Оскільки ізоцитратдегідрогеназа є одним із ключових ферментів аеробного окиснення, що визначають швидкість реакцій циклу трикарбонових кислот, підвищення її активності в мітохондріях гепатопанкреаса риб дослідних груп свідчить про стимуляцію синтетичними стероїдами енергетичних процесів у тканинах. Не виключено, що зміна активності ключових ферментів ана- та аеробного окиснення вуглеводів впливає і на редокс-потенціал мітохондрій гепатоцитів гепатопанкреаса коропів [4].

Відомо, що Гл-6-Фаза каталізує останню реакцію глюконеогенезу, а саме гідроліз глюкозо-6-фосфату з утворенням вільної глюкози і неорганічного фосфору в гепатопанкреасі [35]. Зростання її активності в цитоплазматичній фракції гепатопанкреаса риб дослідних груп можна пояснити стимуляцією синтетичними стероїдами глюконеогенезу (табл. 3.11). На відміну від глюкозо-6-фосфатази, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, будучи ключовим ензимом пентозофосфатного шляху, каталізує реакцію перетворення глюкозо-6-фосфату в глюкозо-1,5-лактон-6-фосфат за участю НАДФ⁺ [35]. Підвищення Гл-6-ФДГ активності у супернатанті гепатопанкреаса риб дослідних груп необхідне ймовірно для відновлення окисненого глутатіону за рахунок НАДФН у відповідь на підвищення рівня активних форм кисню в тканинах внаслідок впливу 19-нортестостерону.

Отже, підвищення активності низки ензимів вуглеводного та енергетичного обмінів, а також переамінування глюкогенних амінокислот у гепатопанкреасі риб під впливом 19-нортестостерону розкриває один із важливих аспектів механізму його впливу на процеси метаболізму в тканинах кісткових риб, що забезпечує їх адаптацію до дії стероїдних гормонів у воді.

Синтетичний стероїд 19-нортестостерон проявляв у риб анаболічний ефект, стимулюючи біосинтез протеїнів у тканинах риб, що підтверджено результатами досліджень одержаних у попередніх експериментах (табл. 3.8, 3.12) [8, 12]. Слід зазначити, що 19-нортестостерон стимулював біосинтез протеїнів у коропів у тканинах як за низької, так і за значної концентрації у воді, але не впливав

на цей процес із підвищенням його рівня з 50 до 200 мкг/дм³. Не дивлячись на це, 19-нортестостерон у вищевказаних концентраціях у воді змінював фракційний склад білків плазми крові риб. Слід відмітити, що білковий спектр плазми крові коропів включав 22 основні фракції протеїнів, молекулярна маса яких коливалась у межах від 16 до 284 кДа (табл. 3.12). Найбільшу кількість становили протеїни з молекулярною масою 17–16, 29–27, 228–220, 240–231 і 266–244 кДа. Менше протеїнів у плазмі крові коропів було з молекулярною масою 284–275, 62–58, 57–56, 55–53 і 52–51 кДа, а вміст інших фракцій був незначним (табл. 3.12). Не дивлячись на те, що 19-нортестостерон проявляв у коропів дослідних груп анаболічний ефект, підвищуючи загальний вміст білків у плазмі крові та гепатопанкреасі, він також змінював їх електрофоретичну рухливість. Відомо, що електрофоретична рухливість білків залежить від заряду білкової молекули на яку впливають рН, концентрація електролітів і значна кількість метаболітів, до складу молекули яких входять вільні аміно- і карбоксильні групи [35]. Встановлені в експерименті значні зміни фракційного складу білків плазми крові у риб дослідних груп відбулися ймовірно внаслідок впливу 19-нортестостерону на вказані вище метаболіти. Не виключено і прямий вплив синтетичних стероїдів на синтез окремих фракцій протеїнів у гепатопанкреасі риб дослідних груп. Виявлено, що в плазмі крові риб першої дослідної групи, які знаходились 24 години у воді з концентрацією 19-нортестостерону 50 мкг/дм³, порівнюючи з контролем, підвищився рівень білків з молекулярною масою 240–231, 215–179, 169–146, 104–95 кДа, а з молекулярною масою 35–33 кДа – знизився, що вказує на перерозподіл окремих фракцій протеїнів внаслідок підвищення вмісту альбумінів (табл. 3.12). Одержані дані узгоджуються з появою в плазмі крові риб першої дослідної групи окремих фракцій білків з молекулярною масою 228–220, 116–105 і 48–44 кДа, які були відсутні у коропів контрольної групи. На підставі одержаних результатів можна зробити висновок про те, що 19-нортестостерон не тільки стимулює синтез білка в гепатопанкреасі, але й впливає на електрофоретичну рухливість білків у плазмі крові риб через низку продуктів обміну вуглеводів та амінокислот.

Встановлені зміни фракційного складу білків плазми крові у риб другої дослідної групи, а саме: підвищення вмісту білків з молекулярною масою 240–231 і 215–179 кДа та зменшення – 35–33 кДа, підтверджують наведений вище висновок (табл. 3.12). Вплив синтетичних стероїдних гормонів на фракційний склад білків плазми крові у коропів дослідних груп залежав також і від концентрації 19-нортестостерону у воді. Саме з цим фактом у плазмі крові пов'язана різниця у вмісті білків з молекулярною масою 228–220, 169–146, 104–95 і 48–44 кДа між їх рівнем у риб першої та другої дослідних груп. Крім того у плазмі крові риб другої дослідної групи не виявлено фракції протеїнів з молекулярною масою 169–146, 104–95 і 48–44 кДа, що ймовірно є наслідком впливу високої концентрації 19-нортестостерону на електрофоретичну рухливість протеїнів плазми крові.

Отже, отримані результати дозволяють зробити висновок, що синтетичний стероїд 19-нортестостерон проявляє у риб анаболічний ефект, стимулює біосинтез протеїнів та активність ензимів обміну вуглеводів та амінокислот, підвищуючи вміст енергетичних субстратів, неорганічного фосфору і заліза в гепатопанкреасі, впливає на фракційний склад білків плазми крові, змінюючи їх електрофоретичну рухливість. Результати досліджень також розкривають важливі аспекти механізму впливу синтетичних стероїдів на метаболічні процеси в тканинах кісткових риб.

Зроблений висновок підтверджено дослідженнями вмісту ендогенних стероїдних гормонів, активності ензимів обміну вуглеводів та амінокислот, рівня ряду енергетичних субстратів, макро- і мікроелементів у гепатопанкреасі та плазмі крові коропів за тривалого впливу 19-нортестостерону. Як і за нетривалого впливу, витримування риб у воді з концентрацією 19-нортестостерону 50 мкг/дм^3 впродовж 72 годин не впливало на вміст тестостерону і прогестерону, але збільшувало рівень кортизолу в гепатопанкреасі риб (табл. 3.16). За концентрації стероїду у воді 200 мкг/дм^3 вміст тестостерону, прогестерону і кортизолу в гепатопанкреасі коропів зростав більшою мірою. Зміна вмісту ендогенних стероїдних гормонів тестостерону, прогестерону і особливо

кортизолу в плазмі крові риб підтверджує висновок про залежність гормонального стану у кісткових риб від екзогенних стероїдів (табл. 3.14, 3.16).

Підвищення концентрації протеїнів у гепатопанкреасі коропів за тривалого впливу 19-нортестостерону пов'язано із анаболічними властивостями синтетичних стероїдів, вмісту глюкози – із активацією гліюконеогенезу, а тригліцеридів – синтезу ліпідів, особливо за рівня досліджуваного стероїду у воді 200 мкг/дм³ (табл. 3.15). Водночас концентрація глюкози, білків, тригліцеридів, холестерину, сечовини, креатиніну, кальцію і неорганічного фосфору в плазмі крові, а також холестерину, сечовини та креатиніну в гепатопанкреасі за різної концентрації 19-нортестостерону у воді не змінювалась. Відсутність змін вмісту вказаних метаболітів у тканинах риб обумовлено розвинутими у кісткових риб адаптаційними механізмами до дії екзогенних стероїдів [73].

Підвищення лактатдегідрогеназної активності в плазмі крові та в надосадовій фракції гепатопанкреаса риб за довготривалого впливу 19-нортестостерону, як і за нетривалої дії, підтверджує висновок про активацію окисно-відновних процесів, а аланінамінотрансферазної і аспаратамінотрансферазної активності в гепатопанкреасі та плазмі крові риб, особливо за високої концентрації стероїду у воді, свідчить про стимуляцію процесів переамінування амінокислот (табл. 3.13, 3.15). Встановлено, що на відміну від короткотермінового впливу 19-нортестостерону, за його довготривалої дії спостерігається зниження креатинфосфаткіназної активності в плазмі крові та надосадовій рідині гепатопанкреаса риб, що ймовірно свідчить про різнонаправлений вплив синтетичних стероїдів на перетворення креатинфосфату, який змінюється за різних термінів експозиції та концентрації цього забруднювача води (табл. 3.13, 3.15).

На основі аналізу та узагальнення результатів досліджень можна зробити висновок, що вплив синтетичних стероїдних гормонів на метаболічні процеси у кісткових риб характеризується збільшенням вмісту ендogenous стероїдів, активацією ензимів обміну вуглеводів, окремих амінокислот, антиоксидантного

захисту, продуктів перекисного окиснення ліпідів, зміною компонентів енергетичного та мінерального обміну в тканинах, фракційного складу білків плазми крові, посиленням дихальної функції за сталого морфологічного складу крові, а їхня дія на фізіологічні функції залежить від концентрації у воді та тривалості дії.

ВИСНОВКИ

Проведеними дослідженнями встановлено, що синтетичні стероїди у кісткових риб володіють анаболічним ефектом, а їхня дія на фізіологічні функції і метаболічні процеси в тканинах залежить від концентрації у воді та тривалості впливу і пов'язана із зміною активності низки ензимів обміну вуглеводів, ліпідів і окремих амінокислот, вмісту ендогенних стероїдних гормонів, компонентів перекисного окиснення ліпідів, обміну енергії та мінеральних речовин, фракційного складу білків плазми крові, посиленням дихальної функції за сталого морфологічного складу крові, маси тіла та внутрішніх органів.

1. У риб під впливом синтетичного стероїду 19-нортестостерону за концентрації у воді 200 мкг/дм^3 і нетривалої дії, на відміну від 50 мкг/дм^3 , зростає кількість дихальних рухів, зменшується швидкість осідання еритроцитів крові в 1,87 рази, а жива вага, маса гепатопанкреаса і селезінки та їхній індекс не змінюється.

2. За короткотривалої дії і різної концентрації у воді синтетичний стероїд 19-нортестостерон не впливає на морфологічний склад крові риб. Концентрація гемоглобіну, кількість еритроцитів і тромбоцитів, а також лейкоцитів та співвідношення їхніх форм у крові риб дослідних груп не змінюється.

3. Вміст малонового диальдегіду, дієнових кон'югатів, каталазна і супероксиддисмутазна активності в плазмі крові та гепатопанкреасі риб під впливом 19-нортестостерону підвищується, за сталого рівня гідроперекисів ліпідів. За концентрації 19-нортестостерону у воді до 200 мкг/дм^3 у гепатопанкреасі риб збільшується вміст дієнових кон'югатів та підвищується супероксиддисмутазна активність, а рівень малонового диальдегіду та каталазна активність у плазмі крові не змінюється.

4. Синтетичний стероїд 19-нортестостерон за нетривалої дії і концентрації у воді 50 мкг/дм^3 не впливає, а за 200 мкг/дм^3 підвищує вміст тестостерону,

прогестерону і кортизолу в гепатопанкреасі, знижує вміст прогестерону та кортизолу і збільшує рівень тестостерону в плазмі крові риб.

5. У плазмі крові риб під впливом 19-нортестостерону підвищується вміст загального протеїну і альбумінів, знижується рівень неорганічного фосфору і заліза, а концентрації глюкози, тригліцеридів, креатиніну і кальцію не змінюється. За дії синтетичного стероїду в гепатопанкреасі риб підвищується вміст протеїнів, альбумінів, глюкози, тригліцеридів і креатиніну, а також неорганічного фосфору та заліза.

6. За короткотривалої дії і концентрації у воді 50 і 200 мкг/дм³ 19-нортестостерон стимулює креатинфосфокіназну і аспартатамінотрансферазну активності, знижує лужнофосфатазну і аланінамінотрансферазну активності плазми крові риб.

7. У гепатопанкреасі риб за дії 19-нортестостерону підвищується лактатдегідрогеназна, аланінамінотрансферазна, аспартатамінотрансферазна, креатинфосфокіназна і лужнофосфатазна активності. За концентрації синтетичного стероїду у воді 200 мкг/дм³ лужнофосфатазна і креатинфосфокіназна активності в надосадовій фракції гомогенату гепатопанкреаса риб знижується, а лактатдегідрогеназна, аспартатамінотрансферазна і аланінамінотрансферазна – не змінюються.

8. Синтетичний стероїд 19-нортестостерон за концентрації у воді 50 мкг/дм³ та нетривалої дії стимулює лактатдегідрогеназну і глюкозо-6-фосфатазну активності в супернатанті, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназну і ізоцитратдегідрогеназну активності в мітохондріальній фракції гепатопанкреаса риб. Підвищення концентрації 19-нортестостерону у воді до 200 мкг/дм³ не впливає на активність ензимів у супернатанті і мітохондріальній фракції гепатопанкреаса риб.

9. У плазмі крові риб 19-нортестостерон за концентрації у воді 50 мкг/дм³ підвищує рівень білків з молекулярною масою 240–95 кДа, знижує – 35–33 кДа і викликає появу білків з молекулярною масою 228–220, 116–105 і 48–44 кДа. За концентрації 19-нортестостерону у воді 200 мкг/дм³ вміст білків у плазмі крові

риб з молекулярною масою 240–231 і 215–179 кДа збільшується, 35–33 кДа – зменшується, а інших фракцій – не змінюється.

10. За довготривалого впливу і концентрації у воді 200 мкг/дм³ 19-нортестостерон підвищує вміст тестостерону, знижує рівень прогестерону і кортизолу в плазмі крові, збільшує вміст тестостерону, прогестерону і кортизолу в гепатопанкреасі, а за концентрації 50 мкг/дм³ не впливає на вказані показники.

11. Стероїдний гормон 19-нортестостерон за довготривалого впливу і концентрації у воді 200 мкг/дм³ підвищує лактатдегідрогеназну, креатинфосфокіназну і аланінамінотрансферазну активності і не впливає на рівень протеїну, глюкози, тригліцеридів, холестеролу, креатиніну, сечовини і кальцію в плазмі крові риb. Гормон 19-нортестостерон за концентрації у воді 50 мкг/дм³ підвищує вміст кальцію і лактатдегідрогеназну активність у плазмі крові риb та не впливає на показники обміну вуглеводів, ліпідів і білків.

12. За довготривалі дії і концентрації у воді 50 мкг/дм³ 19-нортестостерон збільшує вміст протеїнів, глюкози, підвищує лактатдегідрогеназну активність, знижує креатинфосфокіназну активність і не впливає на рівень тригліцеридів, холестеролу, сечовини, кальцію, неорганічного фосфору і заліза в гепатопанкреасі риb. За концентрації 19-нортестостерону у воді 200 мкг/дм³ в гепатопанкреасі риb зростає рівень глюкози, протеїну, тригліцеридів, підвищується аланінамінотрансферазна і аспартатамінотрансферазна активності, знижується креатинфосфокіназна активність, а вміст холестеролу, креатиніну, сечовини, неорганічного фосфору, кальцію та заліза не змінюється.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Виробництву рекомендується використовувати для контролю вмісту стероїдних гормонів у природних водоймах розроблені методичні рекомендації «Оцінка екологічного стану ставів забруднених стічними водами тваринницьких підприємств», а також ряд біохімічних критеріїв риб, встановлених на основі досліджень впливу синтетичних стероїдів на активність ензимів, вміст гормонів, показники ПОЛ та концентрацію окремих показників обміну вуглеводів та протеїнів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бібчук К. В., Жиденко А. О. Стан коропових риб в умовах інтенсивного застосування гербіцидів. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія (спеціальний випуск). Гідроекологія. 2015. № 64 (3–4). С. 74–72.
2. Головіна Н. А., Тромбіцький І. Д. Гематологія ставкових риб. Кишинів: Штіінца, 1989. 160 с.
3. Давидов О. Н., Темніханов Ю. Д., Куровська Л. Я. Патологія крові риб. К.: Медінформ, 2005. 212 с.
4. Жиденко А. О., Бібчук К. В., Барбухо О. В. Вплив гліфосату на енергетичний обмін в органах коропа. Український біохімічний журнал. 2013. № 85 (3). С. 22–30.
5. Жиденко А. О., Бібчук К. В., Полетай В. М., Кривопиша В. В. Значення показників метаболізму печінки для адаптації риб в умовах гербіцидного забруднення водойм. Біологічні системи. 2012. № 4 (4). С. 433–437.
6. Захаренко М. О., Курбатова І. М., Чепіль Л. В. Оцінка токсичної дії нандролону на риб за морфологічними показниками крові. Scientific Journal «Science Rise: Biological Science». 2018. № 1 (10). С. 4–8.
7. Захаренко М. О., Романова Е. Е., Курбатова І. М., Поляковський В. М., Тупицька О. М., Кондратюк В. М. Екотоксикологічна оцінка ставів, забруднених стічними водами тваринницьких підприємств, за біомаркерами риб. Гідробіологічний журнал. 2023. № 59 (6). С. 86–99.
8. Захаренко М. О., Романова Е. Е. Білки плазми крові та вміст метаболітів обміну вуглеводів і ліпідів в генпатопанкреасі риб за дії 19-нортестостерону. Scientific Journal «Science Rise: Biological Science». 2023. № 4 (37). С. 19–24.
9. Захаренко М. О., Романова Е. Е. Вплив 19-нортестостерону на вміст стероїдних гормонів, гематологічні показники та окремі ланки метаболізму

в тканинах коропа (*Cyprinus carpio* L.). Гідробіологічний журнал. 2024. № 60 (2). С. 95–107.

10. Коренєва О. М., Карпенко М. О. Фітоестрогени. Вплив на репродуктивну систему. Проблеми ендокринної патології. 2007. № 3. С. 87–95.

11. Кроненберг Г. М., Мелмед Ш., Полонскі К. С. Репродуктивна ендокринологія: переклад з англійської під редакцією І. І. Дєдова, Г. А. Мельниченко. Видавництво ООО «Рід Елсівєр», 2011. 416 с.

12. Курбатова І. М., Захаренко М. О. Фракційний склад білків крові коропа за дії нандролону та альбендазолу. Біологія тварин. 2016. № 18 (2). С. 51–58.

13. Курбатова І. М., Чепіль Л. В., Євтушенко М. Ю. Активність ферментів плазми крові коропа (*Cyprinus carpio* L.) за дії нандролону. Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. 2017. №. 1. С. 38–45.

14. Курбатова І. М., Іванова О. В., Захаренко М. О. Антибактеріальні препарати, антигельмінтики та гормони відходів свинарського підприємства. Агроєкологічний журнал. 2017. № 3. С. 122–129.

15. Курбатова І. М., Чепіль Л. В., Євтушенко М. Ю. Активність ферментів плазми крові коропа (*Cyprinus carpio* L.) за дії альбендазолу. Гідробіологічний журнал. 2018. № 54 (4). С. 72–77.

16. Лихолат Т. Ю., Лихолат А. О. Вплив синтетичних естрогенів на показники прооксидантної антиоксидантної системи органів щурів різного віку в дослідях *in vivo*. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія. (Біологічні системи). 2016. № 8 (1). С. 8–14.

17. Мехед О. Б., Жиденко А. О., Барбухо О. В. Вплив зенкору на вміст глюкози та активність ферментів глюконеогенезу у тканинах коропа лускатого (*Cyprinus carpio* L.) за різних температур. Український біохімічний журнал. 2004. № 76 (3). С. 110–113.

18. Олексюк Н. П., Янович В. Г. Активність про- і антиоксидантних систем у печінці прісноводних риб у різні періоди року. Український біохімічний журнал. 2010. № 82 (3). С. 41–48.

19. Потрохов О. С., Зінковський О. Г., Худіяш Ю. М., Водяницький О. М. Зміна гормонального статусу аборигенних риб за дії агропромислових стоків. Гідробиологічний журнал. 2023. № 59 (3). С. 106–116.

20. Правдін І. Ф. Керівництво з вивчення риб переважно прісноводних. М.: Харчова промисловість, 1966. 375 с.

21. Романова Е. Е., Захаренко М. О. Активність ензимів метаболізму вуглеводів і амінокислот та перекисне окиснення ліпідів в тканинах коропа за дії 19-нортестостерону. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія. (Біологічні системи). 2023. № 15 (2). С. 122–129.

22. Романова Е. Е., Захаренко М. О., Курбатова І. М. Вміст ендогенних стероїдів та активність ензимів антиоксидантного захисту в тканинах риб за дії 19-нортестостерону. Сучасні екологічні виклики в Україні та світі: І Всеукраїнська науково-практична конференція, 21–22 березня 2024 року: тези доповіді. Київ, 2024. С. 49–52.

23. Шепельська Н. Р., Проданчук М. Г. Фітоестрогени сої і їх антиандрогенна дія. Проблеми харчування. 2010. № 3–4. С. 26–31.

24. Яржомбек А. А., Ламанский В. В., Щербина Т. В. Довідник по фізіології риб. К.: Агропромвидав, 1986. 192 с.

25. Alderman L., McGuire A., Bernier N. J., Vijayan M. M. Central and peripheral glucocorticoid receptors are involved in the plasma cortisol response to an acute stressor in rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*. 2012. № 176. P. 79–85.

26. Amenyogbe E., Chen G., Wang Z., Lu X., Lin M., Lin A. Y. A review on sex steroid hormone estrogen receptors in mammals and fish. *International Journal of Endocrinology*. 2020. Article number 5386193.

27. Amit A., Verma O., Mathur A. Evaluation of Changens in metabolic parameters and Enzymes Involved in Metabolic Pathwaysin *Clarius batrachus* after Exposure to Phenolic Compounds. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Science*. 2014. № 3 (21). P. 60–67.

28. Andersen L., Holbech H., Gessbo A., Norgren L., Petersen G. I. Effects of exposure to 17 α -ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*) Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. Toxicology and Pharmacology. 2003. № 134 (3). P. 365–374.

29. Anderson J. C., Beyger L., Guchardi J., Holdway D. A. The effects of 17 α -Ethinylestradiol on the heart rate of embryonic Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Toxicology of Chemistry. 2020. № 39. P. 904–912.

30. Ayala M. D., Gómez V., Cabas I., Hernández M. P. C., Chaves-Pozo E., Arizcun M. de la Serrana D. G., Gil F. The Effect of 17 α -Ethinylestradiol and GPER1 Activation on Body and Muscle Growth, Muscle Composition and Growth-Related Gene Expression of Gilthead Seabream, *Sparus aurata* L. International Journal of Molecular Sciences. 2021. № 22 (23). Article number 13118.

31. Baki B., Kaya Öztürk D. Comparative Fatty Acid Compositions of Tissues of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) with Different Ploidy and Sex. Turkish Journal of Agriculture – Food Science and Technology. 2023. № 11 (10). P. 1994–2002.

32. Bakos K., Kovács R., Staszny Á., Sipos D. K., Urbányi B., Müller F., Kovács B. Developmental toxicity and estrogenic potency of zearalenone in zebrafish (*Danio Rerio*). Aquatic Toxicology. 2013. № 136. P. 13–21.

33. Balló A., Busznyákné S. K., Czétány P. M. L., Török A., Szántó Á., Máté G. Estrogenic and Non-Estrogenic Disruptor Effect of Zearalenone on Male Reproduction: A Review. International Journal of Molecular Science. 2023. № 24 (2). Article number 1578.

34. Belfroid A. C., Horst A., Van der Vethaak A. D. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste Water in the Netherlands. The Science of the Total Environmental. 1999. № 225 (6). P. 101–108.

35. Berg J., Tymoczko J. L., Stryer L. Biochemistry. Fifth Edition. W. H. Freeman and Company, New York. URL: www.whfreeman.com/biochem5

36. Bergmeyer H. U., Bernt E., Hess B. In Methods of enzymatic Analysis. Verlag Chemie, Weinheim and Academic Press. NeuYork. 1963, P. 736–741.

37. Biochemica information. West Germany: Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica. 1975. № 1–2. 187 p.

38. Booth A. N., Bickoff E. M., Kohler G. O. Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. *Science*. 1960. № 131. P. 1807–1808.

39. Borreli A., Schiaturella A., Bonelli P. The functional role of MnSOD as a biomarker of human diseases and therapeutic potential of a new isoform of a human recombinant MnSOD. *Biomedical Research International*. 2014. № 5. P. 476–789.

40. Breves J. P., Duffy T. A., Einarsdottir I. E., Björnsson B. T., McCormick S. D. In vivo effects of 17α -ethinylestradiol, 17β -estradiol and 4-nonylphenol on insulin-like growth-factor binding proteins (igfbps) in Atlantic salmon. *Aquatic Toxicology*. 2018. № 203. P. 28–39.

41. Burtis C. A., Ashweed E. R., Tietz M. *Textbook of Clinical Chemistry*. 2nd Edition. W. B. Saunders Company. Philadelphia, 1994. P. 1825–1827.

42. Callard G. V., Tchoudakova A. V., Kishida M., Wood E. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of Cyp19 genes in teleost fish. *Journal of Steroid Biochemistry. Molecular Biology*. 2001. № 79. P. 305–314.

43. Carbajal A., Reyes-López E., Tallo-Parra O. Comparative Assessment of Cortisol in Plasma, Skin Mucus and Scales as a Measure of the Hypothalamic-Pituitary-Interrenal Axis Activity in Fish. *Aquaculture*. 2019. № 506. P. 410–416.

44. Carman O., Iskandar A., Chang C.-F., Wu G.-C., Muslim M., Ramadhani D. E. Accelerated of Sex Reversal use 17α -methyltestosterone Induced Female, Orange-Spotted Grouper *Epinephelus coioides*. *Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan*. 2023. № 15 (2). P. 264–277.

45. Casey C. A., Anderson P. M. Subcellular Location of Glutamine Synthetase and Urea Cycle Enzymes in Liver of Spiny Dogfish (*Squalus acanthias*). *Journal Biology Chemistry*. 1982. № 257 (14). P. 8449–8453.

46. Celino-Brady F. T., Petro-Sakuma C. K., Breves J. P., Lerner D. T., Seale A. P. Early-Life exposure to 17β -Estradiol and 4-Nonylphenol impacts the growth

hormone/insulin-like growth-factor system and estrogen receptors in Mozambique Tilapia (*Oreochromis Mossambicus*). *Aquatic Toxicology*. 2019. № 217. Article number 105336.

47. Černá T., Ezechiáš M., Semerád J., Grasserová A., Cajthaml T. Evaluation of estrogenic and antiestrogenic activity in sludge and explanation of individual compound contributions. *Jornal of Hazardous Materials*. 2022. № 423. P. 108–127.

48. Chaturantabut S., Shwartz A., Evason K. J., Cox A. G., Labella K., Schepers A. G., Goessling W. Estrogen Activation of G-Protein–coupled estrogen receptor 1 regulates phosphoinositide 3-Kinase and Mtor signaling to promote liver growth in zebrafish and proliferation of human hepatocytes. *Gastroenterology*. 2019. № 156. P. 1788–1804.

49. Chaves-Pozo E., Garsia-Ayala A., Cabas I. Efferts of Sex Steroids on Fish Leucocytes. *Biology*. 2018. № 1 (9). URL: doi.org/10.3390/biology7010009.

50. Christiansen T., Korsgaard B., Jespersen A. Effects of nonylphenol and 17 beta-oestradiol on vitellogenin synthesis, testicular structure and cytology in male eelpout *Zoarces viviparus*. *Jornal of Expimental Biology*. 1998. № 201. P. 179–192.

51. Cleveland B. M., Weber G. M. Effets of sex steroids on expression of genes regulating growth-related mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General Comparativ Endocrinology*. 2015. № 216. P. 103–115.

52. Cleveland B. M., Weber G. M. Effects of steroid treatment on growth, nutrient partitioning, and expression of genes related to growth and nutrient metabolism in adult triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Domestic Animal Endocrinology*. 2016. Vol. 56. P. 1–12.

53. Das Neves V. J. Effekts of nandrolone and resistance training on the blood pressure, caordiac electrophysiology, and expression of atrial b-adrenergic receptors. *Life Science*. 2013. № 92 (20–21). P. 1029–1035.

54. Elvin T., Malini N., George K. Deleterious effect of short term exposure to xenoestrogen-bisphenol a on certain haematological and physiological profile of Freshwater Murrel Fish. *Channa Striatal Block*. 2018. № 1793 (39). P. 126–133.

55. Endres D. B., Rude R. K. Mineral and bone metabolism. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. Tietz textbook of clinical chemistry. Philadelphia: WB Saunders Company. 1999. P. 1406–1441.

56. Eriksen M., Espmark A., Braastad B. Long-Term Effekts Maternal Cortisol Exposure and Mild Hyperthermia during Embriogeny on Survival, Growth and Morphological Anomalies in Farmed Antlantic Salmon *Salmo salar* Offspring. *Jornal of Fish Biology*. 2007. № 70 (3). P. 462–473.

57. Fairbanks V. F., Klee G. G. Biochemical aspects of hematology. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. Tietz textbook of clinical chemistry. Philadelphia: WB Saunders Company. 1999. P. 1698–1703.

58. Feswick A., Munckittrick K. R., Martyniuk C. J. Estrogen-responsive gene networks in the teleost liver: What are the key molecular indicators? *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2017. № 56. P. 366–374.

59. Filice M., Leo S., Mazza R., Amelio D., Garofalo F., Imbrogno S., Gattuso A. The heart of the adult goldfish (*Carassius auratus*) as a target of bisphenol A: A multifaceted analysis. *Environmental Pollutions*. 2021. № 269. Article number 116177.

60. Forthofer R. N., Lee E. S., Hernandez M. Biostatistics: A Guide to Design, Analysis, and Discovery. Amsterdam, Boston, Heidelberg: Elsevier, 2007. 493 p.

61. Fought E., Vijayan M. M. Mechanism of cortisol action in fish hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2016. № 199. P. 136–145.

62. Gornely S. Determination of serum protein by mean of biuret reaction. *Jornal of Biochemistry*. 1949. № 177 (2). P. 751–755.

63. Guiguen Y. Implication of steroids in fish gonadal sex differentiation and sex inversion. *Current Topics in Steroid Research*. 2000. № 3. P. 127–143.

64. Hampl R., Kubátová J., Stárka L. Steroids and endocrine disruptors-History, recent state of art and open questions. *Jornal of Steroids Biochemistry and Molekular Biology*. 2016. № 155. P. 217–223.

65. Hawkins M. B., Godwin J., Crews D., Thomas P. The distributions of the duplicate oestrogen receptors ER- β a and ER- β b in the forebrain of the Atlantic croaker

(*Micropogonias undulatus*): Evidence for subfunctionalization after gene duplication. *Proceeding Research Sociality. B: Biological Science*. 2005. № 272. P. 633–641.

66. Hou J., Wan W., Mao D. Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides and nitrofurans in livestock manure and amended soil of Northern China. *Environmental Science Pollution Research*. 2015. № 22. P. 4545–4554.

67. Hunson A. M., Ickstadt A. T., Marquart D. J., Kittilson J. D., Sheridan M. A. Environmental estrogens inhibit mRNA and functional expression of growth hormone receptors as well growth hormone signaling pathways *in vitro* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 2016. № 246. P. 120–128.

68. Jobling S., Casey D., Rodgers-Gray T., Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U., Pawlowski S., Baunbeck T., Turner A. P., Tyler C. R. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology*. 2003. № 65 (2). P. 205–220.

69. Kennedy E. K. C., Janz D. M. The Use of Fish Scale Hormone Concentration in the Assessment of Long-Term Stress and Associated Adverse Effects on Reproductive. *Endocrinology Fishes*. 2022. № 7 (6). P. 393–403.

70. Keung W. M. Dietary estrogenic isoflavones are potent inhibitors of B-hydroxysteroid dehydrogenase of P testosterone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995. № 215 (3). P. 1137–1144.

71. Khan D., Ansar Ahmed S. The immune system is a natural target for estrogen action: Opposing effect of estrogen in two prototypical autoimmune diseases. *Frontiers Immunology*. 2015. № 6. P. 635–647.

72. Kicman F. T., Gower D. B. Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives. *Analytical Clinical Biochemistry*. 2003. № 40. P. 321–356.

73. Kim Y. J., Lee N., Woo S., Ryu J. C., Yum S. Transcriptomic change as evidence for Cadmium-induced endocrine disruption in marine fish model of Medaka, *Oryzias Javanicus*. *Molecular Cell Toxicology*. 2016. № 12. P. 409–420.

74. Kirk C. J., Bottomley L., Minican N., Carpenter H., Shaw S., Kohli N., Harris R. M. Environmental endocrine disruptors dysregulate estrogen metabolism and

Ca²⁺ homeostasis in fish and mammals via receptor-independent mechanisms. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. Molekulare Integration Physiology*. 2003. № 135. P. 1–8.

75. Knopp R. H., Paramsothy P., Retzlaff B. M., Fish B., Walden C., Dowdy A., Cheung M. C. Sex differences in lipoprotein metabolism and dietary response: Basis in hormonal differences and implications for cardiovascular disease. *Currency Cardiology Report*. 2006. № 8. P. 452–459.

76. Kurbatova I., Zakharenko M., Chepil L. Effect of chlortetracycline, nandrolone and albendazole on fractional composition of carp serum proteins. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2018. № 8 (1). P. 57–63.

77. Laemmly U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970. № 227, 5259. P. 680–685.

78. Laiz-Carrión R., Martín Del Río M. P., Miguez J. M., Mancera J. M., Soengas J. L. Influence of Cortisol on Osmoregulation and Energy Metabolism in Gilthead Seabream *Sparus aurata*. *Jornal Experimental Zoology. A Comparative Experimental Biology*. 2003. № 298. P. 105–118.

79. Lakin G. *Biometrics*. Higher school. 1990. 352 p.

80. Lam S. H., Lee S. G., Lin C. Y., Thomsen J. S., Fu P. Y., Murthy K. R., Mathavan S. Molecular conservation of estrogen-response associated with cell cycle regulation, hormonal carcinogenesis and cancer in zebrafish and human. *Cancer Cell Lineess, BMC Medicine Genom*. 2011. № 4. P. 41.

81. Lazaro-Velasco A., Isidro-Cristobal H. M., Alcántar-Vázquez J. P., Antonio-Estrada C., Calzada-Ruiz D., Torre R. M. D. L. Effect of the combination of a cold-water temperature and exogenous estrogens on feminization, growth, gonadosomatic index and fat muscle content of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758). *Latina American Jornal Aquatic Research*. 2019. № 47. P. 52–64.

82. Levchenko V. I., Golovakha V. I., Kondrakhin I. P. *Methods of laboratory clinical diagnosis of animal diseases*. K.: Agrarna osvita, 2010. 437 p.

83. Levin E. R. Extranuclear steroid receptors are essential for steroid hormone actions. *Annual Review of Medicine*. 2015. № 14 (66). P. 270–280.

84. Livingston M., Kalansooriya A., Hartland A. J. Serum testosterone levels in male hypogonadism: Why and when to check – A review. *International Journal Clinical Practic.* 2017. № 71 (11). P. 1–9.

85. Loomis A. K., Thomas P. Effects of estrogens and xenoestrogens on androgen production by Atlantic croaker testes in vitro: Evidence for a nongenomic action mediated by an estrogen membrane receptor. *Biology Reproductive.* 2000. № 62. P. 995–1004.

86. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal Biology Chemistry.* 1951. № 197 (1). P. 265–275.

87. Lu S., Lin C., Lei K., Xin M., Wang B., Ouyang W., He M. Endocrine-disrupting chemicals in a typical urbanized bay of yellow sea, China: Distribution, risk assessment, and identification of priority pollutants. *Environmental Pollution.* 2021. № 287. Article number 117588.

88. Luo Z., Tu Y., Li H., Qiu B., Liu Y., Yang Z. Endocrine-disrupting compounds in the Xiangjiang River of China: Spatio-temporal distribution, source apportionment, and risk assessment. *Ecotoxicology Environmental and Safety.* 2019. № 167. P. 476–484.

89. Manor M. L., Cleveland B. M., Weber G. M., Kenney P. B. Effects of sexual maturation and feeding level on fatty acid metabolism gene expression in muscle, liver, and visceral adipose tissue of diploid and triploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* 2015. № 179. № 17–26.

90. Martines-Alvares R. M., Morales A. E., Sanz A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Reviews Fish Biology.* 2005. № 15 (1). P. 75–88.

91. Mehdi Amin M., Bina B., Ibrahimi A., Yavari Z., Mohammadi F., Rahimi S. The occurrence, fate, and distribution of natural and synthetic hormones in different types of wastewater treatment plants in Iran. *Chinese Journal of Chemical Engineering.* 2018. № 26 (5). P. 1132–1139.

92. Meng Q., Yeung K., Kwok M. L., Chung C. T., Hu X. L., Chan K. M. Toxic effects and transcriptome analyses of zebrafish (*Danio Rerio*) larvae exposed to benzophenones. *Environmental Pollution*. 2020. № 265. Article number 114857.

93. Mengqian Zhang, Qian Yang, Rui Shi, Jialin Wang, Ziwei Zhang, Yingming Yang, Wenlong Li, Songlin Chen, Na Wang. Effects of long-term sex steroid hormones (estradiol and testosterone)-supplemented feeds on the growth performance of Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 2022. № 48 (5). P. 1365–1375.

94. Mommsen T., Vijayan M., Moon T. Cortisol in Teleosts: Dynamics, Mechanisms of Action, and Metabolic Regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 1999. № 9 (3). P. 211–268.

95. Monfared A. L., Salati A. P. Histomorphometric and biochemical studies on the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to sublethal concentrations of phenol. *Toxicology Industrial Health*. 2016. № 29 (3). P. 856–861.

96. Moreman J., Takesono A., Trznadel M., Winter M. J., Perry A., Wood M. E., Tyler C. R. Estrogenic mechanisms and cardiac responses following early life exposure to bisphenol A (BPA) and its metabolite 4-Methyl-2, 4-Bis (P-Hydroxyphenyl) Pent-1-Ene (MBP) in zebrafish. *Environmental Science Technology*. 2018. № 52. P. 6656–6665.

97. Moss D. W., Henderson R. A. Clinical Enzymology. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*. Philadelphia:WB Saunders Company. 1999. P. 676–684.

98. Moss D. W., Henderson R. A. Clinical enzymology. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*. Philadelphia:WB Saunders Company, 1999. P. 657–662.

99. Müller A. K., Markert N., Leser K., Kämpfer D., Schiwy S., Riegraf C., Hollert H. Bioavailability and impacts of estrogenic compounds from suspended sediment on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. 2021. № 231. Article number 105719.

100. Muniasamy S., Allen Benziger P. S., Ananth Kumar Y., Haniffa M. A., Paray A. P., Albeshr M. F, Saleh Al-Umri. Effect of 17α -methyl testosterone incorporated diets on growth of spotted snakehead, *Channa punctatus* and white carp, *Cirrhinus mrigala*. Saudi Journal of Biological Sciences. 2019. № 26 (3). P. 541–546.

101. Myronchyk V. V. A.s. № 1084681 SSSR, MKY G № 33/48 Sposob opredelenyja gydroperekysyj lypydov v byologicheskyh tkanjah. 1984. № 3468369/28–13; zajavl. 08.07.82; opubl. 07.04.84. Bjul. 13 (In Ukraine).

102. Nedzvetsky V., Andrievsky G., Chachibaia T., Tykhomyrov A. Differences in antioxidant protective efficacy of hydrated C60 fullerene nanostructures in liver and brain of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Jornal Diabetic Metabolism*. 2012. № 3 (8). P. 1–9.

103. Nelson E. R., Habibi H. R. Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *Genetic Comparative Endocrinology*. 2013. № 192. P. 15–24.

104. Newman D. J., Price C. P. Renal function and nitrogen metabolites. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999. P. 1239–1242.

105. NTP-CERHR Expert Panel Report on the Reproductive and Developmental Toxicity of Genistein. 2006. 256 p.

106. Orozco-Hernández L., Gutiérrez-Gómez A. A., SanJuan-Reyes N., Islas-Flores H., García-Medina S., Galar-Martínez M., Gómez-Oliván L. M. 17β -Estradiol induces cyto-genotoxicity on blood cells of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*. 2018. № 191. P. 118–127.

107. Ostrovsky D., Kitts W. D. Estrogen-Like substances in legumes and grasses: The influence of fractionation and route of administration on the estrogenic activity of plant materials. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1962. № 40. P. 159–164.

108. Paris M., Pettersson K., Schubert M., Bertrand S., Pongratz I., Escriva H., Laudet V. An amphioxus orthologue of the estrogen receptor that does not bind

estradiol: Insights into estrogen receptor evolution. *BMC. Evolution Biology*. 2008. № 8. P. 219.

109. Petrie B., Lopardo L., Proctor K., Youdan J., Barden R., Kasprzyk-Hordern B. Assessment of bisphenol-A in the urban water cycle. *Science of the Total Environment*. 2019. № 650. P. 900–907.

110. Petrie B., Proctor K., Youdan J., Barden R. Critical evaluation of monitoring strategy for the multi-residue determination of 90 chiral and achiral micropollutants in effluent wastewater. *Science of The Total Environment*. 2017. № 579 (1). P. 569–578.

111. Pickering A. D. Growth and Stress in Fish Production. *Aquaculture*. 1993. № 111. P. 51–63.

112. Pinto P. I., Andrade A. R., Estêvão M. D., Alvarado M. V., Felip A., Power D. M. Duplicated membrane estrogen receptors in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Phylogeny, expression and regulation throughout the reproductive cycle. *Jornal Steroid Biochemistry. Molekulare Biology*. 2018. № 178. P. 234–242.

113. Potrokhov O., Zincovskiy G., Khudiyash Yu., Vodianitskyi O. Chang in hormonal status of aboridginal fishes under the impact of agricultural runoffso. *Hidrobiological Jornal*. 2023. № 59 (3). P. 101–109.

114. Prijanka H. P., Krishnan H. C., Singh R. V. Estrogen modulates in vitro T cell responses in a concentration and receptor-dependent manner: effect on intracellular molecular targets and antioxidant enzymes. *Molecular Immunology*. 2013. № 56 (4). P. 328–339.

115. Qingyuan L., Jinchun H., Lin Y., Xinrui W., Feng F., Jiazheng Y., Zang K., Shanjian Z. Effects of exogenous steroid hormones on growth, body color, and gonadal development in the Opsariichthys bidens. *Fish of Physiol Biochemistry*. 2024. № 50 (2). P. 449–461.

116. Radwan E. K., Ibrahim M. B. M., Adel A., Farouk M. The occurrence and risk assessment of phenolic endocrine-disrupting chemicals in egypt's drinking and source water. *Environmental Science Pollution Research*. 2020. № 27. P. 1776–1788.

117. Rajakumar A., Senthilkumaran B. Steroidogenesis and its Regulation in Teleost- a Review. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2020. № 46 (3). P. 803–819.

118. Rembaez K. P., Sawicka E., Dlugosz A. Role of estradiol in chromium-induced oxidative stress. *Acta Polonica Pharmacology*. 2012. № 69 (6). P. 1372–1379.

119. Renaud L., Agarwal N., Richards D. J., Falcinelli S., Hazard E. S., Carnevali O., Hardiman G. Transcriptomic analysis of short-term 17 α -ethynylestradiol exposure in two californian sentinel fish species sardine (*Sardinops Sagax*) and mackerel (*Scomber Japonicus*). *Environmental Pollution*. 2019. № 244. P. 926–937.

120. Riesen W. F. Lipid metabolism. In: Thomas L, ed. *Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results*. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998. P. 169–171.

121. Rosca A. E., Țăreanu V., Mititelu A.-M., Popescu B. O., Badiu C., Caruntu C., Voiculescu S. E., Onisăi M., Gologan S., Mirica R. Effects of Exogenous Androgens on Platelet Activity and Their Thrombogenic Potential in Supraphysiological Administration: A Literature Review. *Jornal Clinical Medicin*. 2021. № 10 (1). P. 147.

122. Sadoul B., Vijayan M. M. Stress and Growth. In *Fish Physiology*; Elsevier Incorporation: Amsterdam, The Netherlands, 2016. № 35. P. 167–205.

123. Samia K., Dhouha A., Anis C., Ammar M., Rim A., Abdelkrim C. Assessment of organic pollutants (PAH and PCB) in surface water: Sediments and shallow groundwater of Grombalia watershed in northeast of Tunisia. *Arabian Journal of Geoscience*. 2018. № 11. P. 34.

124. Santti R. S., Strauss M. L. Phytoestrogens: potential endocrine disruptors in males. *Toxicology and Health*. 1998. № 14 (1–2). P. 223–237.

125. Sarker B., Shawon B. D., Amzad Hossain Ch. M. Optimization of 17 α -methyltestosterone dose to produce quality mono-sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Endocrinology Fishes*. 2022. № 7 (4). P. 245–254.

126. Schachman H. K. *Ultracentrifugation in Biochemistry*. New York: Acad. Press. 1959. 356 p.

127. Scholz S., Mayer I. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Journal of Molecular Cell Endocrinology*. 2008. № 293. P. 57–70.

128. Segner H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. Toxicology and Pharmacology*. 2008. № 149. P. 187–195.

129. Shahidi N. T. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clinical Therapy*. 2001. № 23. P. 1355–1390.

130. Shirdel I., Kalbassi M. R., Esmaeilbeigi M., Tinoush B. Disruptive effects of nonylphenol on reproductive hormones, antioxidant enzymes, and histology of liver, kidney and gonads in caspian trout smolts. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology*. 2020. № 232. Article number 108756.

131. Sovadinová I., Liedtke A., Schirmer K. Effects of clofibric acid alone and in combination with 17 β -Estradiol on mRNA abundance in primary hepatocytes isolated from rainbow trout. *Toxicology in Vitro*. 2014. № 28. P. 1106–1116.

132. Stein W. Creatine kinase (total activity). Creatine kinase isoenzymes and variants. In: Thomas L., ed. *Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results*. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998. P. 71–79.

133. Sun S.-X., Wu J.-L., Lv H.-B., Zhang H.-Y., Zhang J., Limbu S. M., Du Z.-Y. Environmental estrogen exposure converts lipid metabolism in male fish to a female pattern mediated by AMPK And mtor signaling pathways. *Journal of Hazardous Materials*. 2020. № 394. Article number 122537.

134. Thomas L. Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST). In: Thomas L, ed. *Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results*. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998. P. 55–65.

135. Thomas L. Blood glucose. In: Thomas L., ed. *Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results*. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998. P. 131–137.

136. Thomas L. Calcium. In: Thomas L., ed. *Clinical Laboratory Diagnostics Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*, 1st ed. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998. P. 231–241.

137. Thomas L. *Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results*. Frankfurt/Main; TH-Buks Verlagsgesellschaft, 1998. 1527 p.

138. Thomas L. Lactate dehydrogenase (LD). In: Thomas L., ed. *Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results*. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998. P. 89–94.

139. Thomas L. G. *Labor und Diagnose*. TH-Books. Verlags-Gesellschaft. 8 Auflage, 2012. 456 p.

140. Tokarz J., Moller G., Hrabe de Angelis M., Adamski J. Steroids in teleost fishes: A functional point of view. *Steroids*. 2015. № 103. P. 123–144.

141. Tokarz J., Moller G., Hrabe de Angelis M., Adamski J. Steroids in teleost fishes: A functional point of view. *Steroids*. 2015. № 103. P. 123–144.

142. UK-Committee on Toxicity. *Phytoestrogens and health*. London. Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, 2003.

143. Wang Y. Q., Li Y. W., Chen Q. L., Liu Z. H. Long-term exposure of xenoestrogens with environmental relevant concentrations disrupted spermatogenesis of zebrafish through altering sex hormone balance, stimulating germ cell proliferation, meiosis and enhancing apoptosis. *Environmental Pollution*. 2019. № 244. P. 486–494.

144. Warner K. E., Jenkins J. J. Effects of 17 α -Ethinylestradiol and bisphenol a on vertebral development in the fathead Minnow (*Pimephales Promelas*). *Toxicology and Chemistry International Journal*. 2007. № 26. P. 732–737.

145. Wojnarowski K., Cholewińska P., Palić D., Bednarska M., Jarosz M., Wiśniewska I. Estrogen Receptors Mediated Negative Effects of Estrogens and Xenoestrogens in Teleost Fishes-Review. *International Journal of Molecular Science*. 2022. № 23 (5). Article number 2605.

146. Wojnarowski K., Podobiński P., Cholewińska P., Smoliński J., Dorobisz K. Impact of estrogens present in environment on health and welfare of animals. *Animals*. 2021. № 11. Article number 2152.

147. Yamaguchi S., Gen K., Okuzawa K., Matsuyama M., Kagawa H. Influence of estradiol-17 β , testosterone, and 11-ketotestosterone on testicular development, serum steroid hormone, and gonadotropin secretion in male red sea bream *Pagrus major*. *Fishery Science*. 2006. № 72. P. 835–845.

148. Yanda J., Mrhova O., Urbanova D., Linchart D. Effect of anabolic hormone 19-nortestosterone propionate on the metabolism of striated muscle during experimental ischemia. *Pflüger Archives*. 1976. № 361 (2). P. 159–163.

149. Zaki M. S., Fawzi O. M., Refat A. Y. Biochemical and clinicopathological studies in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fish exposed to pollution by heavy metals. *International Journal of Pharmacology and Research*. 2016. № 9 (12). P. 838–842.

150. Zhang H., Shi J., Liu X., Zhan X., Chen Q. Occurrence and removal of free estrogens, conjugated estrogens, and bisphenol A in manure treatment facilities in East China. 2014. № 58 (1). P. 248–257.

151. Zhang X., Zhong H., Han Z., Tang Z., Xiao J., Guo Z., Zhou Y. Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on hepatic lipid metabolism genes in *Tilapia (Oreochromis Niloticus)*. *Aquaculture Reports*. 2020. № 17. Article number 100382.

152. Zhang Y., Zhu Z., Liu Q., Zhang M., Yang H., Wei W. Bisphenol A disrupts Apolipoprotein e expression through estrogen-related receptor gamma and DNA methylation in the liver of male rare Minnow (*Gobiocypris Rarus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021. № 228. Article number 113041.

153. Zhou X., Yang Z., Luo Z., Li H., Chen G. Endocrine disrupting chemicals in wild freshwater fishes: Species, tissues, sizes and human health risks. *Environmental Pollution*. 2019. № 244. P. 462–468.

Додатки

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**Стаття у науковому виданні, включеному до міжнародних наукометричних баз даних Scopus та/або Web of Science Core Collection**

1. Захаренко М. О., **Романова Е. Е.** Вплив 19-нортестостерону на вміст стероїдних гормонів, гематологічні показники та окремі ланки метаболізму в тканинах коропа (*Cyprinus carpio* L.). Гідробіологічний журнал. 2024. Т. 60. № 2. С. 95–107.

Статті у наукових фахових виданнях України

2. **Романова Е. Е.**, Захаренко М. О. Активність ензимів метаболізму вуглеводів і амінокислот та перекисне окиснення ліпідів в тканинах коропа за дії 19-нортестостерону. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). 2023. Т. 15. Вип. 2. С. 122–129.

3. Захаренко М. О., **Романова Е. Е.** Білки плазми крові та вміст метаболітів обміну вуглеводів і ліпідів в гепатопанкреасі риб за дії 19-нортестостерону. Science Rise: Biological Science. 2023. № 4 37). С. 19–24.

Науково-практичні рекомендації

4. Захаренко М. О., Курбатова І. М., Поляковський В. М., Заєць Н. А., Чепіль Л. В., **Романова Е. Е.** Оцінка екологічного стану ставів, забруднених стічними водами тваринницьких підприємств: науково-практичні рекомендації. Київ: НУБіП України, 2022. 22 с.

Тези наукових доповідей

5. Захаренко М. О., **Романова Е. Е.**, Курбатова І. М., Поляковський В. М. Вміст гормонів та метаболітів проміжного обміну в плазмі крові риб за дії нандролону. Іновації в житті людей: XII Міжнародна наукова конференція, 8–10 червня 2022 року: тези доповіді. Манчестер, Великобританія, 2022. С. 52.

6. **Романова Е. Е.**, Захаренко М. О., Курбатова І. М. Фракційний склад білків плазми крові риб за різної концентрації нандролону у воді. Сучасна наука:

іновації та очікування: X Міжнародна науково-практична конференція, 22–27 червня 2022 року: тези доповіді. Стокгольм. Швеція, 2022. С. 35.

7. **Романова Е. Е.**, Курбатова І. М., Захаренко М. О. Вміст ендогенних стероїдів та активність ензимів антиоксидантного захисту в тканинах риб за дії 19-нортестостерону. Сучасні екологічні виклики в Україні та світі: перша всеукраїнська науково-практична конференція, 21–22 березня 2024 року: тези доповіді. Київ, 2024. С. 49–52.

8. Захаренко М. О., Курбатова І. М., **Романова Е. Е.** Активність ензимів обміну вуглеводів та вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів в тканинах риб за різної концентрації 19-нортестостерону у воді. V International Scientific and Practical Conference, 15–17 April 2024: report theses. Vienna, Austria, 2024. С. 21–25.