

ЕКОЛОГІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ ВОДНИХ ТВАРИН

УДК 546.56:574.52

Н.Б. ЄСПОВА, к. б. н., доцент,
Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара,
пр. Науки, 72, Дніпро, 49000, Україна
e-mail: yesipova.natalia@gmail.com
ORCID 0000-0003-1924-2547

Н.О. ХРОМИХ, к. б. н., ст. дослідник,
Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара,
пр. Науки, 72, Дніпро, 49000, Україна
e-mail: khromykh2012@gmail.com
ORCID 0000-0003-3543-352X

Т.С. ШАРАМОК, к. с.-г. н., доцент,
Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара,
пр. Науки, 72, Дніпро, 49000, Україна
e-mail: sharamok@i.ua
ORCID 0000-0003-3523-5283

О.М. МАРЕНКОВ, к. б. н., доцент,
Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара,
пр. Науки, 72, Дніпро, 49000, Україна
e-mail: gidrobions@gmail.com
ORCID 0000-0002-3456-2496

Д.В. ЖУРАВЛЬОВ, аспірант,
Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара,
пр. Науки, 72, Дніпро, 49000, Україна
e-mail: dzhuravlov01@gmail.com

І.О. ЧУМАКОВ, студент
Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара,
пр. Науки, 72, Дніпро, 49000, Україна
e-mail: igors9061459@gmail.com

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ, ЗЯБЕР І М'ЯЗОВОЇ ТКАНИНИ РИБ В УМОВАХ ХРОНІЧНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ МІДДЮ

*Збільшення фонові концентрації міді до 20 мкг/дм³ (20 ГДК) у водоймах мілітаризованої зони України потребує всебічного вивчення її впливу на риб та інших гідробіонтів. У модельному експерименті досліджували хронічний вплив (21 день) міді в концентрації 20 мкг/дм³ (0,3 μМ) на органи і тканини риб гуппі (*Poecilia reticulata*). Окислювальний стрес оцінювали за рівнем накопичення малонового діальдегіду*

Ц и т у в а н н я: Єсіпова Н.Б., Хроміх Н.О., Шарамок Т.С., Маренков О.М., Журавльов Д.В., Чумаков І.О. Структурно-функціональний стан печінки, зябер і м'язової тканини риб в умовах хронічної інтоксикації міддю. *Гідробіол. журн.* 2025. Т. 61, № 6. С. 48—61.

(МДА) в тканинах. Рівень функціонування ферментативних захисних механізмів у клітинах оцінювали за активністю глутатіон-S-трансферази (GST). Гістопатологічні наслідки дії міді виявляли в зябрах і печінці риб. Хронічна дія міді індукувала збільшення вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів у зябрах, печінці і м'язах, що вказує на порушення окислювально-відновлювального балансу в тканинах. Розвиток окислювального стресу відбувався на фоні зниження активності GST в зябрах і печінці, що свідчить про виснаження антиоксидантного захисту та активації ферменту в м'язах риб. Наслідками оксидативного стресу в печінці риб були обширний гепатоз, стаз крові в капілярах, пікноз і розвиток апоптозних ознак у гепатоцитах. У зябрах риб спостерігалась повна або часткова дегенерація ламел, викривлення їхніх кінцевих ділянок, гіперплазія епітелію і пошкодження кровоносних капілярів у ламелах. Виявлені наслідки хронічного впливу міді на органи травної і дихальної систем риб свідчать про деструктивні зміни в стані здоров'я, що може стати потенційною загрозою стану популяцій риб у природних умовах. Отримані результати вказують на необхідність проведення подальших досліджень впливу фонових концентрацій міді та інших важких металів на іхтіофауну постмілітаризованих водойм.

Ключові слова: мідь, фонові концентрації, риби, оксидативний стрес, гістопатологія.

Мідь (Cu) є постійним компонентом природного водного середовища і як есенціальний мікроелемент необхідна для нормального росту і обміну речовин у живих організмах. Але в надлишковій кількості мідь переходить в категорію важких металів і проявляє токсичну дію на гідробіонтів [22].

Забруднення водойм міддю та іншими важкими металами є розповсюдженим явищем, оскільки вони містяться в стічних водах багатьох промислових і сільськогосподарських підприємств [24]. Підтримання високих концентрацій міді у воді забезпечується також її ксенобіотичними властивостями. Мідь здатна накопичуватися і перерозподілятися в живих і неживих компонентах екосистеми, які стають джерелами вторинного забруднення води [20].

В Україні проблема забруднення середовища міддю та іншими важкими металами загострилась з початком масштабних бойових дій [5, 9]. Ведення сучасних збройних конфліктів призводить до токсичного забруднення акваторій небезпечними хімічними сполуками [36]. Мідь не є вибуховою речовиною, але використовується як компонент у виробництві вибухових речовин, а також у деяких типах військового обладнання [6]. Моніторингові дослідження свідчать, що в Запорізькому (Дніпровському) водосховищі концентрація міді у воді за два роки війни збільшилась з $0,011 \pm 0,001$ мг/дм³ [7] до $0,021$ мг/дм³ [3], тобто перевищує рибогосподарські ГДК більше ніж у 20 разів.

Токсичний вплив міді на риб та інших водних мешканців відображений у численних наукових роботах. Встановлено [29], що на рівні молекулярних ефектів вплив міді індукує утворення активних форм кисню (АФК), які активують процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і створюють загрозу окислювального стресу. Антиоксидантні системи клітин (ферментативні і неферментативні) відповідають за нейтралізацію АФК і запобігання окисненню клітинних компонентів. Зокрема, деякі ізо-

форми глутатіон-S-трансферази (GST) забезпечують кон'югацію продуктів розпаду пероксидів ліпідів, використовуючи GSH як субстрат [29]. Тому глутатіон-S-трансфераза слугує біомаркером забруднення середовища, який може вказувати як на хронічний вплив комплексу забруднюючих речовин, так і на короткочасне небезпечне забруднення [13]. У ситуаціях, коли виробництво АФК перевищує антиоксидантну здатність клітини, молекули ліпідів і білків піддаються окисненню [25], а продукти їх окиснення відіграють важливу роль в індукції апоптозу, генетично контрольованої та еволюційно збереженої форми активної смерті клітин [29].

Гістопатологічні зміни в клітинах і тканинах риб широко використовуються як біомаркери для оцінки токсичного впливу міді та інших важких металів [40]. Чутливим індикатором забруднення води визнано клітини зябер, оскільки вони безпосередньо контактують із зовнішнім середовищем. Вплив розчинів важких металів, включно з розчинами міді, на морфофункціональні показники зябер риб описано в різних роботах [17, 41]. Показано, що за умов впливу іонів міді на карася сріблястого (*Carassius gibelio*), навіть при короткотривалій експозиції (4 доби) відбувається активація процесів апоптозу в зябрах, а також поява аномальних клітин з різними порушеннями мітозу і зазначено, що використані цитогенетичні показники виявились більш чутливими до впливу іонів міді, ніж зміни на рівні цілого організму риб [2].

Встановлено, що накопичення міді відбувається переважно в печінці риб [31]. За сублетальних концентрацій міді у нільської тиліпії (*Oreochromis niloticus*) спостерігалась інфільтрація тканини печінки клітинами крові, вакуолізація цитоплазми гепатоцитів, пікноз ядер [11].

Вплив сублетальних концентрацій міді на камбалу (*Solea senegalensis*) супроводжувався збільшенням жирових вакуолей в гепатоцитах; синусоїди і венули були заповнені еритроцитами, спостерігався гепатоцелюлярний некроз. Також виявлено інтенсивну вакуолізацію клітин і пікноз ядер [40].

У коропа (*Cyprinus carpio*) за сублетальних концентрацій міді в печінці були виражені дистрофічні ураження і гідропічна вакуолярна дегенерація гепатоцитів, розширення капілярів, гіперемія та холестаз [38].

Значно менше інформації стосовно впливу міді на репродуктивні органи риб [12]. Встановлено, що вміст міді в статевих залозах *Carassius auratus* і *Xiphophorus helleri* зростає лінійно зі збільшенням сублетальних концентрацій міді у воді. Одночасно спостерігалось зниження швидкості росту та репродуктивної здатності досліджуваних риб. Відмічено також зменшення середнього діаметру яйцеклітин у *Carassius auratus* [30]. Утримання риб за сублетальних концентрацій міді (0,6, 1,2 і 1,8 мг/дм³) гальмувало рухливість сперматозоїдів і знижувало частку запліднення та коефіцієнт вилуплення [35]. Відмічено негативний вплив міді на ендокринну систему риб [33] та активність гонадотропних гормонів [14].

Доведено, що гостра токсичність і фізіологічний вплив міді на риб залежать від багатьох факторів [26, 34], а не тільки від концентрації і часу експозиції, і тому ці питання потребують поглибленого вивчення. Водно-

час надійними біомаркерами впливу міді на водні екосистеми є гістопатологічні зміни у риб.

Незважаючи на накопичені дані, вивчення проблеми токсичного впливу міді на риб не втрачає своєї актуальності. Збільшення фонових концентрацій міді у водоймах потребує дослідження їхнього хронічного впливу на стан здоров'я риб. Слід мати на увазі, що існуючі ГДК забруднюючих речовин, зокрема міді, мають узагальнений характер і не можуть передбачити вплив токсикантів на всі процеси в організмі риб. Ефективним шляхом вирішення цієї проблеми є застосування біотестування з використанням сучасних методів досліджень [1]. Результати означених завдань становлять інтерес не тільки для науки, а й для практичного рибництва в плані оцінки стану здоров'я риб та прогнозів рибопродуктивності.

Метою нашої роботи було дослідити в умовах хронічного експерименту вплив міді в концентрації 20 мкг/дм³, яка фіксується в рибогосподарських водоймах мілітаризованої зони України, на ферментативну активність і гістологічну структуру органів дихальної і травної систем риб.

Матеріал і методика досліджень

Модельний експеримент проводили на базі кафедри загальної біології та водних біоресурсів та НДІ біології Дніпровського національного університету ім. Олесь Гончара. Як тестовий об'єкт були використані гуппі (*Poecilia reticulata*) однієї генерації у віці 5 місяців, поділені на контрольну і дослідну групи, кожна у двох повтореннях. У кожному акваріум помістили по 20 риб у співвідношенні самок і самців 1:1. Початкова маса риб у дослідному акваріумі становила 0,24±0,01 г, у контрольному — 0,22±0,01 г.

У дослідних акваріумах підтримували концентрацію міді 20 мкг/дм³ (0,3 μМ) шляхом повної заміни води кожні три дні і додавання відповідної кількості розчину CuSO₄. Оптимальну для гуппі температуру води (24 °C) підтримували за допомогою обігрівача. Риб годували два рази на добу сухим кормом «Gurru» фірми Tetra з добовою нормою корму 5 % від загальної маси риб. Хронічний експеримент тривав 21 день, після чого досліджували морфологічні, біохімічні, гістологічні і цитометричні показники риб. Відповідно до Європейської Конвенції «Про гуманне ставлення до лабораторних тварин» усі маніпуляції з рибами проводили з дотриманням правил біоетики в умовах анестезії з використанням гвоздичної олії.

Морфологічний аналіз включав визначення індивідуальної маси риб і іхтіологічної довжини (від вершини риля до кінця лускатого покриву). Для оцінки впливу міді на ріст риб розраховували відносний приріст маси за період експерименту. Ефективність живлення риб визначали за коефіцієнтом вгодованості за Фультоном, який розраховували за формулою:

$$K_b = \frac{m}{l^3} \times 100,$$

де K_b — коефіцієнт вгодованості (од.), m — індивідуальна маса риби, г; l — іхтіологічна довжина, см.

Вплив міді на перебіг перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за рівнем накопичення малонового діальдегіду (МДА) у м'язах, печінці та зябрах риб, використовуючи відомий метод [32] у модифікації [4]. Вміст МДА вираховували за оптичною густиною реакційної суміші при 532 нм після реакції з тіобарбітуровою кислотою при кип'ятінні впродовж 30 хв і виражали як нмоль МДА /г тканини.

Функціонування ферментативних захисних механізмів у зябрах, печінці та м'язах риб оцінювали за рівнем активності глутатіон-S-трансферази (GST, КФ 2.5.1.18) згідно методу [19]. Активність GST вираховували за зміною оптичної густини реакційної суміші при 340 нм з 2,4-динітрохлорбензолом як субстратом і виражали у нмоль/сек × г (або нкат/г) тканини.

Вплив міді на гістологічну структуру органів вивчали шляхом виготовлення гістологічних зрізів печінки і зябер дослідних і контрольних риб. Фіксацію матеріалу проводили в 10 %-вому водному розчині нейтрального формаліну впродовж 24 год. Перед заливанням у парафін промитий матеріал зневоднювали у спиртах (етанол) з поступовим збільшенням концентрації, просвітлювали в ксилолі за температури 37 °С, витримуючи в кожному з розчинників від 2 до 4 год. Надалі матеріал поміщали в насичений розчин парафін-ксилолу за температури 54 °С впродовж 1 год, у двох змінах парафіну по 2 год у кожній за такої ж температури і заливали у парафінові блоки. Зрізи тканин завтовшки 10 мкм виготовляли на мікротомі МС-2 та забарвлювали гематоксиліном і еозином.

Фотографії гістологічних препаратів робили за допомогою цифрової фотокамери SIGETA M3 CMOS 25000, яку підключали до мікроскопа Ulab XY-B2TLED. Обчислення проводили за допомогою програми Science LabView7. На препаратах досліджували по 40 полів за збільшення об'єктиву мікроскопа 10× і 40×. Статистичне опрацювання отриманих даних здійснювали за допомогою програмного пакету STATISTICA з використанням критерія Ст'юдента на 5 %-вому рівні значущості.

Результати досліджень та їх обговорення

Протягом всього експериментального періоду смертності риб у дослідних і контрольних акваріумах не відмічалось. Риби були активні в поведінці і харчуванні. Кінцева маса риб у досліді становила $0,38 \pm 0,06$ г, у контролі — $0,42 \pm 0,17$ г. Різниця між показниками не мала вірогідних відмінностей ($p \geq 0,05$). Відносний приріст маси у дослідних і контрольних риб суттєво не відрізнявся і становив відповідно 58,3 та 61,5 %. Коефіцієнт вгодованості за Фультоном дорівнював у досліді $2,55 \pm 0,08$ од., у контролі $2,46 \pm 0,06$ од. і теж не мав вірогідних відмінностей ($p \geq 0,05$). Тобто, досліджувана концентрація міді (20 мкг/дм^3) протягом трьох тижнів

не спричинила впливу на ріст риб. Аналогічні результати були отримані іншими дослідниками при хронічному утриманні *Danio rerio* у розчинах з концентрацією міді 10 і 20 мкг/дм³, але збільшення концентрації міді до 40 мкг/дм³ призвело до вірогідного гальмування росту у самців даніо [14].

Рівень накопичення малонового діальдегіду у всіх тканинах дослідних риб достовірно ($p \leq 0,05$) перевищував контрольні величини, що свідчить про інтенсифікацію процесів ПОЛ за хронічної дії міді на організм риб (табл. 1).

Найбільше зростання вмісту МДА (в 2,1 раза вище за контроль) зареєстровано в зябрах гуппі. Отримані результати щодо токсичного впливу міді відповідають загальновідомим закономірностям, згідно яких зябра є першим органом риб, який піддається впливу водних забруднювачів [23].

Подібна активація перекисного окиснення ліпідів у зябрах риб за дії міді виявлена і в інших дослідах, зокрема, показано зростання вмісту МДА в 1,4 раза в зябрах коропа (*Cyprinus carpio* var. Jian) за впливу сульфату міді в концентрації 12,5 μ M впродовж чотирьох діб [26, 28].

Значне посилення процесів ПОЛ відбувалось також в клітинах печінки гуппі (вміст МДА в 1,5 раза вище за контроль). Результати свідчать про токсичність міді за хронічного впливу на печінку риб та узгоджуються з даними [23], згідно з якими печінка є першим місцем відкладення та накопичення міді після потрапляння в кров. Зростання рівня пероксидів ліпідів було виявлено в зябрах (на 76 %) та печінці (на 95-110 %) *Carassius auratus* внаслідок 96-годинного впливу хлориду міді [21].

Активність глутатіон-S-трансферази внаслідок хронічної дії міді на риб в усіх досліджених тканинах зазнала різких змін, демонструючи як помітне зростання, так і суттєве зниження (табл. 2).

Активація глутатіон-S-трансферази (в 1,5 раза вище за контроль) виявлено у м'язах риб, які, на відміну від зябер і печінки, не характеризують

Таблиця 1

Зміни вмісту МДА у тканинах риб за хронічної (21 доба) дії міді в концентрації 20 мкг/дм³, $M \pm m$, $n = 5$

Тканини	Вміст МДА, нмоль/г тканини	До контролю, %
М'язи (контроль)	9,53 \pm 0,14	100
М'язи (дослід)	9,99 \pm 0,09*	104,82
Печінка (контроль)	25,84 \pm 0,23	100
Печінка (дослід)	38,79 \pm 0,28*	150,13
Зябра (контроль)	120,33 \pm 0,31	100
Зябра (дослід)	248,35 \pm 0,72*	205,39

Примітка. Тут і в табл. 2, 3: * відмінність між дослідними і контрольними показниками вірогідна ($p \leq 0,05$).

Таблиця 2

Зміни активності GST у тканинах риб за хронічної (21 доба) дії міді в концентрації 20 мкг/дм³, $M \pm m$, $n = 5$

Тканини	Активність GST, нкат/г тканини	До контролю, %
М'язи (контроль)	22,30±1,84	100
М'язи (дослід)	34,34±1,32*	153,99
Печінка (контроль)	358,03±0,79	100
Печінка (дослід)	241,97±1,06*	67,59
Зябра (контроль)	99,05±1,32	100
Зябра (дослід)	78,97±1,62*	79,73

ться високим рівнем накопичення міді [23]. Проте, за умов тривалої експозиції вочевидь відбулось проникнення і відкладання міді також у структурних компонентах м'язів риб, що індукувало посилення ферментативного антиоксидантного захисту, зокрема зростання активності глутатіон S-трансферази.

У зябрах і печінці риб хронічний вплив міді призвів до зниження активності GST (відповідно, в 1,3 та 1,5 рази нижче за контроль), що свідчить про спад ефективності механізмів ферментативного захисту в цих тканинах. З огляду на те, що мідь накопичується в основному в зябрах, печінці та кишечнику риби [23], можна припустити перевантаження і виснаження системи антиоксидантного захисту в цих тканинах внаслідок надзвичайно високого рівня накопичення міді за хронічної дії.

Отримані результати узгоджуються з даними [16] про те, що метали в токсичних концентраціях впливають на GST або шляхом прямого пригнічення активності ферменту, або опосередковано, шляхом зниження концентрації відновленого глутатіону, що є субстратом для GST. Подібну втрату активності глутатіон-S-трансферази (в 1,5 рази нижче за контроль) виявлено в зябрах коропа (*C. carpio* var. Jian) за експозиції до сульфату міді в концентрації 12.5 μ M впродовж чотирьох діб, що супроводжувалось зниженням вмісту відновленого глутатіону та активності інших антиоксидантних ферментів [26]. Зниження активності GST (в 1,4 рази нижче за контроль) в зябрах коропа (*C. carpio* var. Jian) відбувалось також за умов гіпоксії на фоні зниження вмісту відновленого глутатіону [28].

Отримані нами результати показали, що хронічний вплив міді на риб спричиняє збільшення інтенсивності процесів ПОЛ у тканинах зябер, печінки і м'язів, а також виснаження ферментативного антиоксидантного захисту у зябрах і печінці. Більше того, кінцевий продукт перекисного окиснення ліпідів МДА є хімічно активним і може призводити до пошкодження біомолекул [18]. Отже, нездатність клітинних захисних систем протистояти руйнівній дії АФК стає однією з основних причин пошкодження та загибелі клітин.

Гістологічні показники органів риб узгоджуються з даними біохімічних досліджень. Хронічна дія міді призводила до надмірного накопичення жиру і розвитку жирового гепатозу в печінці дослідних риб (рис. 1). Більшість клітин ($72,5 \pm 8,93$ % від загальної кількості) мала ознаки жирового гепатозу (табл. 3). Такі гепатоцити втратили чіткість контурів, їхні ядра деформувалися і змістилися до периферії, цитоплазма ледве проглядається біля ядра або клітинної оболонки (рис. 1, 5). Надмірне накопичення жиру в гепатоцитах дослідних риб призводило до вірогідного збільшення їхньої площі (див. табл. 3). Різниця з контрольними показниками становила 26 %. У деяких клітин ядра зникли і жирові вакуолі злилися, утворюючи жирові кісти (рис. 1, 1). Відмічається стаз крові в капілярах (рис. 1, 4).

Відносна кількість некротичних гепатоцитів на зрізах коливалася в межах від 6 до 17 % і в середньому становила $12,5 \pm 0,84$ % (див. табл. 3). Клітини в стані апоптозу (пікноз ядер) становили від 12 до 26 % (у середньому $22,80 \pm 1,77$ %).

У контрольній групі риб кількість клітин з ознаками жирового гепатозу була в 4 рази меншою порівняно з дослідним варіантом і становила $17,50 \pm 3,11$ % від загальної кількості клітин. Накопичення певної кількості жиру в печінці притаманно для гуппі при вирощуванні в штучних умовах. На відміну від дослідних риб, некрозу гепатоцитів з пікнотичними ядрами у риб контрольного варіанту ми не спостерігали. Кількість

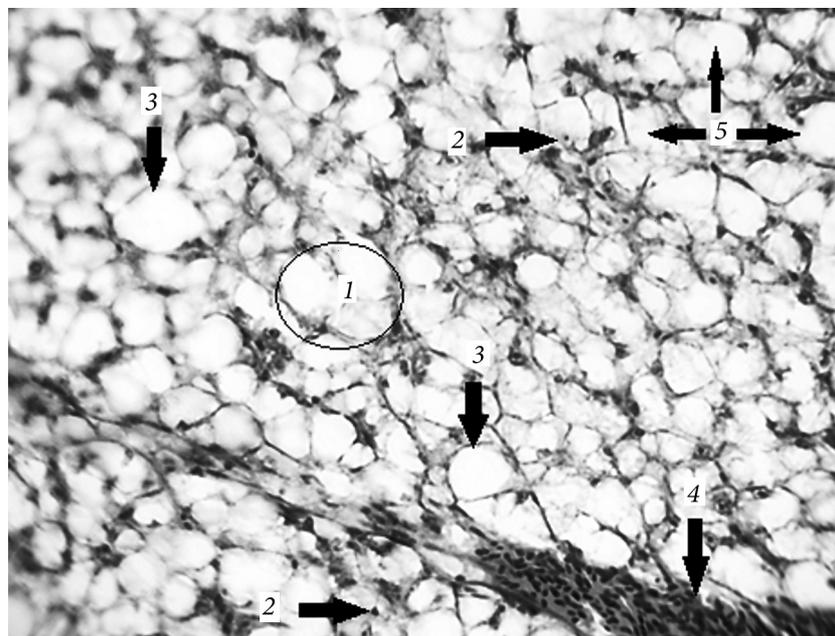


Рис. 1. Структура печінки дослідних риб за умов хронічної (21 доба) дії міді в концентрації 20 мкг/дм^3 (зб. $40\times$): 1 — жирові кісти; 2 — апоптозний гепатоцит з пікнотичним ядром; 3 — некроз гепатоцита; 4 — стаз крові; 5 — жировий гепатоз

Таблиця 3

Зміни морфометричних показників органів у риб за хронічної (21 доба) дії міді в концентрації 20 мкг/дм³, $M \pm m$, $n = 100$

Показники	Дослід	Контроль
Жировий гепатоз, %	72,50±8,93*	17,50±3,11
Некроз гепатоцитів, %	12,50±0,84	не виявлено
Апоптоз гепатоцитів, %	22,80±1,77*	6,80±0,12
Площа гепатоцитів, мкм ²	410,18±36,64*	302,78±16,80
Довжина зябрових ламел, мкм	36,95±1,23*	97,96±0,82
Апоптоз епітеліоцитів зябрових ламел, %	30,40±4,32*	8,52±0,17

клітин печінки в стані апоптозу становила 6,80±0,12 %, що в 3,3 раза менше порівняно з дослідним варіантом ($p \leq 0,05$).

Отже, довготривалий вплив на риб фонові концентрації міді (20 мкг/дм³) призводив до розвитку жирового гепатозу і патологій, що його супроводжують. Аналогічні зміни в печінці риб спостерігалися в досліді з високими сублетальними концентраціями міді при короткотривалій експозиції [10, 11, 37, 38].

Наслідки хронічного впливу міді на зябра дослідних риб відображені на рисунку 2: це повна або часткова дегенерація ламел (Б, 1), викривлення кінцевих ділянок ламел (Б, 2), гіперплазія епітелію (Б, 3), пошкодження кровоносних капілярів у ламелах.

У риб контрольного варіанту зяброві ламели були прямі, однакової довжини, без дегенеративних явищ (рис. 3, а, б). Їхня довжина майже втричі перевищувала довжину зябрових ламел дослідних риб (див. табл. 3).

Хронічний вплив міді викликав гіперплазію і гіпертрофію зябрового епітелію у 100 % досліджених риб. У дослідних риб 30,4 % епітеліоцитів зябер були в стані апоптозу, на відміну від контрольного варіанту, де апоптозних клітин було всього 8,5 %. Роль міді як тригера апоптозних змін у зябрах відмічають і інші дослідники [29]. З апоптозом зябер під дією міді пов'язують також виявлені в органі цитогенетичні зміни, які проявлялися в порушенні послідовності транскрипції генів [26].

Встановлено, що при короткотривалому впливі (10 днів) високих концентрацій міді (LC_{50}) уражається зябровий епітелій риб [15]. Довготривалий вплив високих концентрацій міді призводив до дегенерації і скорочення зябрових ламел [10]. За нашими дослідженнями хронічний вплив фонові концентрації міді викликав не тільки ураження зябрового епітелію, але й морфологічні зміни зябрових ламел (вірогідне укорочення довжини, викривлення і деградацію), які мають незворотній характер і свідчать про патологію зябрового апарату.

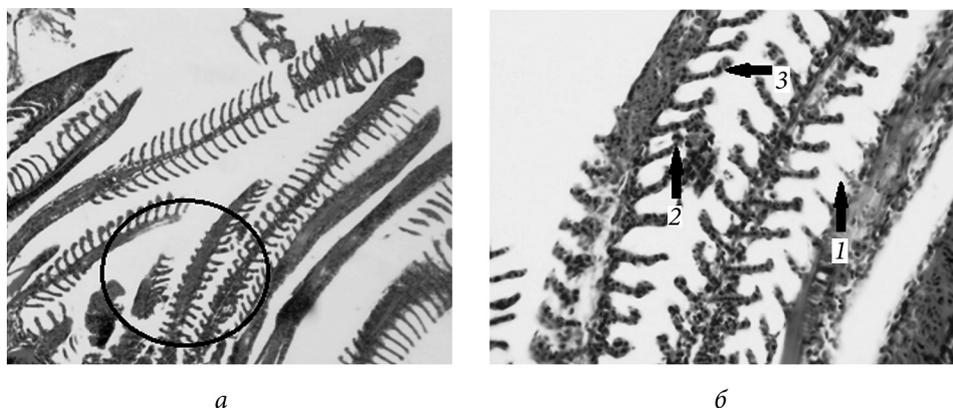


Рис. 2. Структура зябер у риб дослідного варіанту при різному збільшенні мікроскопу: *a* — збільшення 10 \times , кружком виокремлено ділянку зябер з патологічними змінами; *б* — збільшення 40 \times , стрілками позначено: 1 — дегенерація ламел; 2 — викривлення ламел; 3 — гіперплазія епітелію

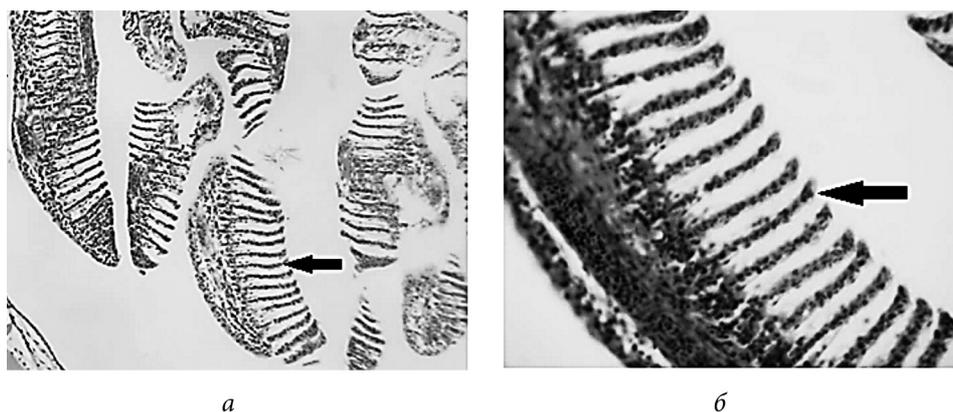


Рис. 3. Структура зябер у риб контрольного варіанту при збільшенні мікроскопу 10 \times (*a*) та 40 \times (*б*): стрілками позначено зяброві ламели

Гістологічні зміни в зябровому апараті риб під впливом хронічної інтоксикації міддю є закономірним наслідком порушення окислювальних процесів і ферментативної активності в зябрах. Чутливість зябер до оксидативного стресу відмічається різними авторами [26, 28] і підтверджена нашими дослідженнями.

Висновки

Результати модельних експериментів на гуппі показали, що хронічна дія фонові концентрації міді (20 мкг/дм³), що спостерігається у водах мілітаризованої зони України, індукувала у риб окислювальний стрес, який проявлявся в збільшенні перекисного окислення ліпідів у зябрах, печінці і м'язах. Посилення окислювальних процесів супроводжувалось зниженням активності глутатіон-S-трансферази і виснаженням

антиоксидантного захисту в зябрах і печінці на фоні активації глутатіон-S-трансферази в м'язах риб внаслідок накопичення міді в цих тканинах.

Наслідками оксидативного стресу в печінці риб були обширний гепатоз, стаз крові у капілярах, пікноз і розвиток апоптозних ознак гепатоцитів. У зябрах досліджуваних риб спостерігалась повна або часткова дегенерація ламел, викривлення їхніх кінцевих ділянок, гіперплазія епітелію ламел і пошкодження кровоносних капілярів у ламелах.

Отже, виявлені структурно-функціональні зміни в органах травної і дихальної систем риб під впливом хронічної інтоксикації міддю мають патологічний характер і становлять загрозу стану здоров'я та відтворенню природних популяцій риб. Зазначена проблема потребує додаткових досліджень із визначенням впливу фонових концентрацій міді у водоймах мілітаризованих зон на репродуктивну систему і потомство риб.

Список використаної літератури

1. Гандзюра В.П., Клименко М.О., Бедункова О.О. Біосистеми в токсичному середовищі: монографія. Рівне: НУВГП, 2021. 261 с.
2. Верголяс М.Р., Веялкіна Н.М., Гончарук В.В. Вплив іонів міді на гематологічні та цитогенетичні показники прісноводних риб *Carassius auratus gibelio*. *Цитология и генетика*. 2010. № 2. С. 65—70.
3. Єсіпова Н.Б. Шарамок Т.С., Скляр Т.В. та ін. Гідроекологічна характеристика сучасного стану Запорізького (Дніпровського) водосховища та його притоків. *Рибогосп. наука України*. 2023. № 4(66). С. 35—48.
4. Методичні вказівки до проведення лабораторних занять з курсу «Дослідження вільнорадикальних процесів у живих організмах» / під заг. ред. В.І. Луцка. Вид-во Прикарпат. нац. ун-ту ім. Василя Стефаника, 2014. 27 с.
5. Циганенко-Дзюбенко І.Ю., Гандзюра В.П., Алпатова О.М. та ін. Гідрохімічний статус пост-мілітарних водних екосистем с. Мошун Київської області. *Екол. науки*. 2023. № 1(46). С. 53—58.
6. Циганенко-Дзюбенко І., Кірейцева Г. Фізіолого-біохімічні механізми стійкості *Planorbis corneus* L. до впливу хімічних стресорів війни. *Наук. Вісн. Вінниць. акад. безперервної освіти. Серія «Екологія. Публічне управління та адміністрування»*. 2023. Вип. 4. С. 19—25.
7. Шарамок Т.С., Федоненко О.В., Курченко В.О., Ніколенко Ю.В. Гідроекологічна оцінка Запорізького водосховища. *Питання біоіндикації та екології*. 2019. Вип 24. № 2. С. 147—161.
8. Abdel-Khalek A.A., Al-Quraishy S., Abdel-Gaber R. Long-term exposure to the water of Wadi El-Rayan Lakes induced testicular damage and endocrine disruption in *Mugil cephalus*. *Springer Nature Link*. 2022. Vol. 108. P. 663—671.
9. Alpatova O., Maksymenko I., Patseva I. et al. Hydrochemical state of the post-military operations water ecosystems of the Moschun, Kyiv region. 16th Intern. conf. monitoring of geological processes and ecological condition of the environment. European Association of Geoscientists & Engineers. 2022. N 1. P. 1—5.
10. Al-Tamimi A.H., Al-Azzawi A.J., Al-A'dhmi M.A. Chronic toxicity assessment of histological changes and micronuclei in fish *Cyprinus carpio* L. after exposed to copper. *Amer. Sci. Res. J. Engineer., Technol. Sci*. 2015. Vol.13, N 1. P. 194—210.
11. Badran S.R., Hamed A. Is the trend toward a sustainable green synthesis of copper oxide nanoparticles completely safe for *Oreochromis niloticus* when compared to chemical ones?: using oxidative stress, bioaccumulation, and histological biomarkers. *Environ. Sci. Pollu. Res*. 2024. Vol. 31. P. 9477—9494.

12. Bera T., Kumar S.V., Devi M.S. et al. Effect of heavy metals in fish reproduction: A review. *J. Environ. Biol.* 2022. Vol. 43, N 5. P. 631—642.
13. Bocedi A., Gambardella G., Cattani G. et al. Erythrocyte glutathione transferase. A sensitive Up-Down biomarker of environmental and industrial pollution. *Arch. Biochem. Biophys.* 2023. Vol. 750. 109786.
14. Cao J., Wang G., Wang T. et al. Copper caused reproductive endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 2019. Vol. 211. P. 124—136.
15. Delahaut V., Raskovirc B., Salvado M.S. et al. Toxicity and bioaccumulation of cadmium, copper and zinc in a direct comparison at equitoxic concentrations in common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *PLoS One.* 2020. Vol. 15, N 4. e0220485.
16. Dobritzsch D., Grancharov K., Hermsen C. et al. Inhibitory effect of metals on animal and plant glutathione transferases. *J. Trace Elements in Medicine and Biology.* 2020. Vol. 57. P. 48—56.
17. Fernandes M.N., Mazon A.F. Environmental pollution and fish gill morphology. *Fish Adaptation* / Ed. by A.L. Val, B.C. Kapoor. Enfield: Sci. Publ., 2003. P. 203—231.
18. Garcia D., Lima D., da Silva D.G.H., de Almeida E.A. Decreased malondialdehyde levels in fish (*Astyanax altiparanae*) exposed to diesel: Evidence of metabolism by aldehyde dehydrogenase in the liver and excretion in water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2020. Vol. 190. 110107.
19. Habig W.H., Jakoby W.B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Meth. Enzymol.* 1981. Vol. 77. P. 398 — 405.
20. Hossain M., Rakkibu Md.G. Effects of copper on aquatic ecosystems-a review. *Khulna Univ. Stud.* 1999. P. 259—266.
21. Husak V.V., Mosiichuk N.M., Kubrak O.I. et al. Acute exposure to copper induces variable intensity of oxidative stress in goldfish tissues. *Fish Physiol. Biochem.* 2018. Vol. 44, N 3. P. 841—852.
22. Jiang W.D., Liu Y., Hu K. et al. Copper exposure induces oxidative injury, disturbs the antioxidant system and changes the Nrf2/ARE (CuZnSOD) signaling in the fish brain: Protective effects of myo-inositol. *Aquat. Toxicol.* 2014. Vol. 155. P. 301—313.
23. Jiang W.D., Wu P., Kuang S.Y. et al. Myo-inositol prevents copper-induced oxidative damage and changes in antioxidant capacity in various organs and the enterocytes of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquat Toxicol.* 2011. Vol. 105, N 3—4. P. 543—551.
24. Kovacik A., Tvrda E., Tomka M. et al. Seasonal assessment of selected trace elements in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) blood and their effects on the biochemistry and oxidative stress markers. *Environ. Monit. Assess.* 2023. Vol. 195, N 12. 1522.
25. Li H.T., Jiang W.D., Liu Y. et al. Dietary glutamine improves the function of erythrocytes through its metabolites in juvenile carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture.* 2017. Vol. 474. P. 86—94.
26. Li H., Liu H., Wu S. et al. Effects of ferulic acid on respiratory metabolism, oxidative lesions, and apoptotic parameters in gills and red blood cells of Carp (*Cyprinus carpio* Var. Jian) response to copper. *Antioxidants.* 2024. Vol. 13, N 3. 314.
27. Li H.T., Ma Y.T., Liu Y. et al. Integrated biomarker parameters response to the toxic effects of high stocking density, CuSO₄, and trichlorfon on fish and protective role mediated by *Angelica sinensis* extract. *Fish Physiol. Biochem.* 2020. Vol. 46. P. 1679—1698.
28. Long J., Yang P., Liu Y. et al. The extract of *Angelica sinensis* inhibits hypoxia-reoxygenation and copper-induced oxidative lesions and apoptosis in Branchiae and red blood corpuscles of fish. *Vet. Sci.* 2024. Vol. 11, N 1. P. 1—17.
29. Luzio A., Monteiro S.M., Fontainhas-Fernandes A.A. et al. Copper induced upregulation of apoptosis related genes in zebrafish (*Danio rerio*) gill. *Aquat. Toxicol.* 2013. Vol. 128—129. P. 183—189.
30. Malhotra N., Ger T.-R., Uapipatanakul B. et al. Review of copper and copper nanoparticle toxicity in fish. *Nanomaterials.* 2020. Vol. 10. 1126.

31. McGeer J.C., Szebedinszky C., Gordon McDonald D., Wood C.M. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. *Aquat. Toxicol.* 2000. Vol. 50, N 3. P. 245—256.
32. Michara M., Uchiyama M., Fukuzava R. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCL4 intoxication, and vitamin E deficiency. *Biochem. Med.* 1980. Vol. 23, N 2. P. 302—311.
33. Motta C. M., Simoniello P., Di Lorenzo M. et al. Endocrine disrupting effects of copper and cadmium in the oocytes of the Antarctic Emerald rockcod *Trematomus bernacchii*. *Chemosphere.* 2021. Vol. 268. 129282.
34. Padrih S.N., Sabullah M.K., Shukor M.Yu.A. et al. Toxicity effects of fish histopathology on copper accumulation. *J. Trop. Agric. Sci.* 2018. Vol. 41, N 2. P. 519—540.
35. Pinto G.L., Castro J. da S., Val A.L. Copper and cadmium impair sperm performance, fertilization and hatching of oocytes from Amazonian fish *Colossoma macropomum*. *Chemosphere.* 2020. Vol. 266. 128957.
36. Repez F., Atanasiu M. The environment — a “Silent Victim” of armed conflicts. *AUDRI.* 2019. Vol. 12, N 2. P. 123—133.
37. Sabullah M.K., Shukor M.Y., Sulaiman M.R. et al. The effect of copper on the ultrastructure of *Puntius javanicus* hepatocyte. *Austral. J. Basic App. Sci.* 2014. Vol. 8, N 15. P. 245—51.
38. Sevcikova M., Modra H., Blahova J. et al. Biochemical, haematological and oxidative stress responses of common carp (*Cyprinus carpio* L.) after sub-chronic exposure to copper. *Vet. Med.* 2016. Vol. 611. P. 35—50.
39. Sharon G., Zilberg D. Atlas of fish histology and histopathology. *Arava Research and Development Centers*, 2011. 77 p.
40. Tavares-Dias M. Toxic, physiological, histomorphological, growth performance and antiparasitic effects of copper sulphate in fish aquaculture. *Aquaculture.* 2021. Vol. 535. 736350.
41. Wood C.M. Toxic responses of the gill. *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*. Vol. 1 / Ed. by D. Schlenck, W.H. Benson. — London : Taylor & Francis, 2001. P. 1—89.

Надійшла 21.04.2025

N.B. Yesipova, PhD (Biol.), Associate Professor,
Oles Honchar Dnipro National University,
Nauky Avenue, 72, Dnipro, 49000, Ukraine
e-mail: yesipova.natalia@gmail.com
ORCID 0000-0003-1924-2547

N.O. Khromykh, PhD (Biol.), Senior Researcher,
Oles Honchar Dnipro National University,
Nauky Avenue, 72, Dnipro, 49000, Ukraine
e-mail: khromykh2012@gmail.com
ORCID 0000-0003-3543-352X

T.S. Sharamok, PhD (Agricuilt.), Associate Professor,
Oles Honchar Dnipro National University,
Nauky Avenue, 72, Dnipro, 49000, Ukraine
e-mail: sharamok@i.ua
ORCID 0000-0003-3523-5283

O.M. Marenkov, PhD (Biol.), Associate Professor,
Oles Honchar Dnipro National University,
Nauky Avenue, 72, Dnipro, 49000, Ukraine
e-mail: gidrobions@gmail.com
ORCID 0000-0002-3456-2496

D.V. Zhuravlov, PhD student,
Oles Honchar Dnipro National University,
Nauky Avenue, 72, Dnipro, 49000, Ukraine
e-mail: dzhuravlov01@gmail.com

I.O. Chumakov, student,
Oles Honchar Dnipro National University,
Nauky Avenue, 72, Dnipro, 49000, Ukraine
e-mail: igors9061459@gmail.com

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF THE LIVER, GILLS, AND MUSCLE TISSUE OF FISH IN CONDITIONS OF CHRONIC COPPER INTOXICATION

*The increase in the background copper concentration to 20 mg/dm³ (20 MPC) in the water bodies of the militarized zone of Ukraine requires comprehensive research of its impact on fish and other aquatic organisms. In a model experiment, the chronic effect (21 days) of copper at a concentration of 20 mg/dm³ (0.3 mM) on the organs and tissues of guppy fish (*Poecilia reticulata*) was studied. Oxidative stress intensity was assessed by the accumulation of malondialdehyde (MDA) in the tissues. The enzymatic defense mechanisms functioning in cells was assessed by the activity of glutathione S-transferase (GST). Histopathological consequences of copper exposure were detected in the fish gills and liver. The study results showed that chronic exposure to copper induced an increase in the lipid peroxidation products content in the gills, liver, and muscles, indicating the redox balance violation in the tissues. The development of oxidative stress occurred against the background of a decrease in GST activity in the gills and liver, which indicated the depletion of antioxidant defenses, and the enzyme activation in the fish muscles. The consequences of oxidative stress in the fish liver were extensive hepatosis, blood stasis in the capillaries, pyknosis, and the development of apoptotic signs in hepatocytes. In the gills of fish, complete or partial degeneration of the lamellae, curvature of their end sections, epithelial hyperplasia, and damage to blood capillaries in the lamellae were observed. The identified consequences of chronic exposure to copper on the organs of the digestive and respiratory systems of fish indicate destructive changes in health, which can become a serious threat to the number of their stocks in natural conditions. The results obtained indicate the need for further studies of the impact of background concentrations of copper and other heavy metals on the ichthyofauna of post-militarized reservoirs.*

Keywords: copper, background concentration, fish, oxidative stress, histopathology.