



Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.
Серія: Ветеринарні науки

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.
Series: Veterinary sciences

ISSN 2518-7554 print
ISSN 2518-1327 online

doi: 10.32718/nvlvet9405
http://nvlvet.com.ua

UDC 619:615.283.015.099:639.215.2

Study of acute and subacute toxicity parameters of “Rybokhin” biological product on the model of carp

A.V. Yevtushenko, O.S. Sirenko, V.S. Boyko, M.E. Romanko

National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkov, Ukraine

Article info

Received 22.03.2019
Received in revised form
22.04.2019
Accepted 23.04.2019

Yevtushenko, A.V., Sirenko, O.S., Boyko, V.S., & Romanko, M.E. (2019). Study of acute and subacute toxicity parameters of “Rybokhin” biological product on the model of carp. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 21(94), 25–32. doi: 10.32718/nvlvet9405

National Scientific Center
“Institute of Experimental and
Clinical Veterinary Medicine”,
Pushkinska Str., 82,
Kharkov, 61023, Ukraine
Tel.: +38067-706-88-22
E-mail: aevt76@gmail.com

The goal of the work was to study of acute and subacute toxicity parameters of “Rybokhin” biological product (AI – chloroquine refer to derivatives 4-aminohinolines) on the model of carp. This drug is effective in the treatment of diseases caused by parasitic Protozoa and Monogenea. Carp scales of two years old were used in experiments. To determine acute toxicity, the fish were prescribed with chloroquine (by AI) in doses of 100; 200; 300; 400; 500; 600; 800; 1000 mg/kg of live weight. Two experimental and control fish groups of 30 individuals each were formed to determine subacute toxicity of “Rybokhin”. Experimental groups of fish were prescribed with “Rybokhin” in a dose (by AI) of 50 mg/kg and 10 mg/kg for two consecutive days. Blood samples were collected from six fish species from each group for clinical and biochemical indicators after 48 hours, 7, 14, 21 and 28 days. The hemoglobin content, number of red blood cells and leukocytes blood were determined. The intensity of peroxide oxidation of lipids (POL), catalase activity, level of total antioxidant capacity (TAC), total proteins, albumin, globulins and glucose, circulating immune complexes (CIC) and seromucoids concentration, level of enzymatic activity: aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), α -amylase blood plasma were determined. According to the research results, indicators of acute toxicity for carp were determined, namely LD_{50} of chloroquine is 528.66 ± 68.01 mg/kg; LD_{16} – 224.512 mg/kg; LD_{84} – 832.81 mg/kg; LD_{100} – 984.89 mg/kg, which indicate that the drug is low-toxic to fish (belongs to the fourth group of toxicity). When administrating of 50.0 mg/kg of “Rybokhin” (by AI) twice a day, the most expressed metabolic changes in fish body were observed on 21 day after its last administration. Thus, the drug’s toxic impact is in proteinogram alteration, transamination processes and in decreasing of fish immune reactivity. It points to the prevalence of catalytic processes over anabolic. Metabolic alterations are obviously directed to the activation of detoxication processes with increased energy use in fish body after getting of higher dosage of the product. So, on 28 day of experiment, the major part of studied parameters retrieved to control level. It was found that when the product was administrated twice a day in the dosage 10.0 mg/kg (by AI), which is used for treatment of parasitic diseases, no reliable changes of clinical and biochemical indices were detected in fish blood during the experiment.

Key words: chloroquine, fish, lethal dose, acute toxicity, submerged toxicity, blood, clinical and biochemical indicators.

Вивчення параметрів гострої та підгострої токсичності препарату “Рибохін” на моделі коропа

A.V. Євтушенко, O.C. Сіренко, B.C. Бойко, M.Є. Романько

Національний науковий центр “Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини”,
м. Харків, Україна

Метою досліджень було визначити параметри гострої та підгострої токсичності препарату “Рибохін” (ДР – хлорохін, який є похідною 4-амінохінолінів) на моделі коропа лускатого. Даний препарат є ефективним при лікуванні захворювань, спричинених паразитичними найпростішими (Protozoa) та моногенетичними присиснями (Monogenea). У експериментах використовували коропа лускатого дволітнього віку. При визначенні гострої токсичності риbam задавали хлорохін (ДР) у дозах 100; 200; 300; 400; 500; 600; 800; 1000 мг/кг маси тіла. Для визначення підгострої токсичності препарату “Рибохін” було сформовано дві дослідні та контрольна групи риб по 30 особин у кожній. Рибі дослідних груп дві доби поспіль задавали препарат “Рибохін” у добовій дозі 50 мг/кг та 10 мг/кг маси тіла (за ДР). Через 48 год, 7, 14, 21 та 28 діб з метою клініко-біохімічних досліджень проводили відбір крові у шести особин риб з кожної групи. У крові визначали вміст гемоглобіну, кількість еритроцитів і лейкоцитів. У плазмі крові визначали інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), каталазну активність, рівень загальної антиокиснювальної активності (загальна АОА); вміст загальних протеїнів, альбуміну і глюкози; концентрацію циркулюючих імунних комплексів (ЦК) і серомукоїдів; рівень ензиматичної активності: аспартатамінотрансферази (АсАТ), аланінамінотрансферази (АлАТ) і α -амілази. За результатами досліджень визначено показники гострої токсичності для коропа: LD_{50} хлорохіну становить $528,66 \pm 68,01$ мг/кг; $LD_{16} - 224,512$ мг/кг; $LD_{84} - 832,81$ мг/кг; $LD_{100} - 984,89$ мг/кг маси тіла, які вказують, що препарат є малотоксичним для риб (належить до четвертої групи токсичності). Максимальну вираженість метаболічних змін в організмі риб за дворазового застосування препарату “Рибохін” в добовій дозі 50,0 мг/кг маси тіла (за ДР) виявляли на 21-шу добу після останнього задавання. Так, механізми токсичної дії препарату полягають у перебудовах в протеїнограмі і процесах переамінування та сальмуванні імунної реактивності в організмі риб, що вказує на превалювання катаболічних процесів над анаболічними. Метаболічні перебудови, очевидно, спрямовані на активацію процесів детоксикації з підвищенням енергетичних затрат в організмі риби внаслідок потрапляння підвищених доз препарату. Отже, на 28-му добу експерименту левова частка досліджених показників за значенням відновлювалась до контрольного рівня. Встановлено, що за дворазового введення препарату в добовій дозі 10,0 мг/кг маси тіла (за ДР), яка є лікувальною при боротьбі із паразитарними хворобами, у динаміці експерименту не виявляли достовірних змін клініко-біохімічних показників крові дослідних риб.

Ключові слова: хлорохін, риба, летальна доза, гостра токсичність, підгостра токсичність, кров, клініко-біохімічні показники.

Вступ

Хлорохін ($C_{18}H_{26}ClN_3$) належить до похідних 4-амінохінолінів, механізм дії яких полягає у пригніченні синтезу ДНК, що спричиняє загибель плазмодій паразитів та амеб. У ссавців препарат швидко та практично повністю всмоктується з ШКТ, створюючи максимальну концентрацію у крові через 2–6 год. У великих концентраціях виявляється в органах та тканинах (печінці, нирках, селезінці). Постійний рівень хлорохіну в плазмі крові реєструється через сім діб після початку застосування. У незначній мірі метаболізується в організмі, 70% виводиться у незмінному виді. Виділяється з організму повільно: концентрація в плазмі крові знижується на 50% протягом трьох діб (Vaziri & Warburton, 1994).

Хлорохін застосовується у медицині для лікування та профілактики малярії, позакишкового амeboзу, амeboного абсцесу печінки, хронічної та підгострої форми системного червоного вовчака, склеродермії, ревматоїдного артриту, фотодерматозу, пізньої шкірної порфірії (Krafts et al., 2012).

Актуальність досліджень обумовлено ефективністю даного засобу при лікуванні захворювань, спричинених паразитичними найпростішими (Protozoa) та моногенетичними присиснями (клас Monogenea) (Hemdal, 2013), тому визначення його впливу на організм риб вимагає проведення додаткових досліджень.

Метою досліджень було визначити параметри гострої (летальної) та підгострої токсичності препарату “Рибохін” на моделі коропа лускатого.

Матеріал і методи досліджень

Дослід з визначення гострої токсичності хлорохіну проводили, як описано (Коцюмбас І.Я., 2006), модифікованих для коропа (Kotsiumbas, 2006). У досліді використовували коропа лускатого дволітнього віку. При цьому було проведено попередній дослід з ви-

значення орієнтовної середньо смертельної дози, після чого у трьох послідовностях здійснювали розгорнутий дослід з визначення основних параметрів гострої токсичності: $DL_{50} \pm m$, DL_0 , DL_{100} , DL_{16} , DL_{84} , які розраховували за Прозоровским В.Б. (2007) (Prozorovskij, 2007).

На наступному етапі досліджень визначали вплив препарату “Рибохін” на біохімічні та клінічні показники крові риб у динаміці підгострого токсикологічного експерименту. Дослід проводили з використанням коропа дволітнього віку. При цьому було сформовано дві дослідні та контрольна групи риб по 30 особин у кожній. Риби кожної групи утримувались в окремих акваріумах ємністю 200 дм³ зі штучною аерацією та температури 18–22 С. У першій та другій дослідних групах риби дві доби поспіль задавали препарат “Рибохін” у добовій дозі 50 мг/кг та 10 мг/кг маси тіла (за ДР) відповідно. Препарат риbam задавали індивідуально за допомогою катетеру на основі 1% крохмального клейстеру. У контрольній групі риби задавали крохмальний клейстер без препарату (Demidov & Berezkina, 1986). З метою клініко-біохімічних досліджень через 48 год, 7, 14, 21 та 28 діб проводили відбір крові у шести особин риб з кожної групи. Кров забирали пастерівською піпеткою із хвостової артерії за загальноприйнятим методом. При цьому для досліджень клінічних показників кров стабілізували гепарином, для визначення біохімічних показників отримували сироватку крові.

Маніпуляції над рибами здійснювали відповідно до існуючих нормативних документів, що регламентують організацію робіт із використанням експериментальних тварин і дотримання принципів “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях” (European convention ...).

Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у плазмі крові визначали за рівнем утворення його продуктів: первинних – дієнових

кон'югатів (ДК) і кінцевих – малонового діальдегіду (ТБК-активних продуктів) за умов екстракції у суміші гептанізопропанол (1:1), як описано (Gavrilov & Mishkorudnaja, 1983); за довжини хвиль 233 і 247 нм; значення ДК виражали у mkmole/dm^3 , а МДА – в одиницях питомого поглинання у $1,0 \text{ cm}^3 (\Delta\text{D/cm}^3)$.

Каталазну активність (К. Ф. 1.11.1.6) у плазмі крові визначали, як описано (Koroljuk, 1988), з використанням H_2O_2 у середовищі інкубації (0,04412 N розчин H_2O_2 , 0,01 N розчин KH_2PO_4 , 0,1 M Tris-HCl буфер, рН 7,4, 4,5 % розчин амонію молібденовокислого); за температури $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$; за довжини хвилі 410 нм; виражали у $\text{mkmole H}_2\text{O}_2/\text{dm}^3$ за 1 хв.

Рівень загальної антиокиснювальної активності (загальна АОА) у плазмі крові визначали, як описано (Klebanov, 1988), за сумарною здатністю структурних антиоксидантів гальмувати накопичення ТБК-активних продуктів, індукованих в середовищі 25 mM FeSO_4 у 0,002 N HCl; за довжини хвилі 535 нм; виражали у % інгібіції утворення ТБК-активних продуктів.

Рівень гематологічних показників та вміст загальних протеїнів, альбуміну, глюкози та рівень ензиматичної активності: аспаратамінотрансферази (AST, К. Ф. 2.6.1.1), аланінамінотрансферази (ALT, К. Ф. 2.6.1.2), α -амілази (К. Ф. 3.2.1.1) у плазмі крові визначали загальноприйнятими методами та з використанням наборів реактивів виробництва CORMAY

(Poland), як описано в довіднику (Vlizlo, 2012). Концентрацію циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) середньої молекулярної маси визначали, як описано (Kondrahin, 1985), осаджуванням білкових комплексів антиген-антитіло PEG-6000; серомукоїдів, як описано (Men'shikov, 1987); за довжини хвиль 260 і 280 нм; виражали у mg/cm^3 .

Реєстрацію біохімічних показників здійснювали на спектрофотометрі SHIMADZU UV-1800 (Japan).

Статистична обробка отриманих результатів здійснювали згідно з рекомендаціями з біометрії за допомогою пакета прикладних програм Microsoft Excel for Windows XP.

Результати та їх обговорення

При проведенні орієнтовного дослідження з визначення гострої токсичності хлорохіну (ДР) для ставкових риб препарат задавали у дозах 0,1 г, 1 г, 5 г, 10 г на 1 кг маси тіла. У групах риб, яким задавали препарат у дозі вище за 1 г/кг реєстрували 100% загибель риб, у дозі 0,1 г/кг маси тіла загибелі риб не реєстрували. За результатами цього дослідження було проведено розгорнутий дослід, в якому рибам задавали хлорохін (ДР) у дозах 100 мг/кг, 200 мг/кг, 300 мг/кг, 400 мг/кг, 500 мг/кг, 600 мг/кг, 800 мг/кг, 1000 мг/кг маси тіла. Результати проведеного дослідження наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Результати досліджень щодо визначення параметрів гострої летальної дози хлорохіну (n = 8)

Група риб	Кількість риб у групі	Доза хлорохіну (ДР), мг/кг маси тіла	Кількість загиблих риб	%	Початок загибелі (доба)
1	8	100	0	0	–
2	8	200	0	0	–
3	8	300	1	13	2
4	8	400	4	50	2
5	8	500	6	75	1
6	8	600	3	38	1
7	8	800	6	75	1
8	8	1000	8	100	1
9	8	контроль	0	0	–

Після задоволення препарату протягом першої доби загинули всі вісім риб у восьмій дослідній групі, по шість риб у п'ятій та сьомій групах, три риби у шостій групі. На другу доби загинуло чотири риби у четвертій дослідній групі та одна риба у третій дослідній групі. Більше загибелі риб в жодній дослідній групі протягом 21 доби спостережень не реєстрували. У дев'ятій (контрольній) групі загибелі риб протягом всього періоду досліджень також не реєстрували.

За отриманими даними було проведено розрахунок параметрів токсичності хлорохіну для коропа, результати якого наведені у таблиці 2.

Отже, для коропа лускатого LD_{50} хлорохіну становить $528,66 \pm 68,01 \text{ мг/кг}$; $\text{LD}_{16} = 224,512 \text{ мг/кг}$; $\text{LD}_{84} =$

$832,81 \text{ мг/кг}$; $\text{LD}_{100} = 984,89 \text{ мг/кг}$ маси тіла, які вказують, що препарат є малотоксичним для риб (належить до четвертої групи токсичності).

Для визначення впливу препарату “Рибохін” на організм риб були проведені дослідження з визначення деяких клініко-біохімічних показників крові при введенні лікувальної дози та дози, що перевищує таку у п'ять разів.

Протягом усього періоду досліджень змін поведінки у риб дослідних та контрольної груп не реєстрували: риби активно плавали та вживали корм, жодна особина риби не загинула.

У таблиці 3 наведені результати досліджень динаміки гематологічних показників.

Таблиця 2

Результати розрахунку параметрів токсичності хлорохіну для коропа

Стимул (Доза)	Відсоток (%)	N	Пробіт (Y)	Ваговий коефіцієнт (Z)
200	0,03125	8	3,1368	1,2737
300	0,125	8	3,8496	3,0487
400	0,5	8	5,0000	5,000
500	0,75	8	5,6742	4,1516
600	0,375	8	4,6818	4,6818
800	0,75	8	5,6742	4,1516
1000	0,96875	8	6,86315	1,2737
Регресійна статистика				
LD ₅₀	528,66	LD ₅₀ Стандартна похибка		68,01
Нижня границя LD ₅₀ (LD ₅₀ LCL)	286,67	Верхня границя LD ₅₀ (LD ₅₀ UCL)		770,65
Бета	0,00329	Y-перетинання (intercept)		3,2618
Бета Стандартна похибка		0,0010		
LD ₁₀	138,82	LD ₁₆	224,512	
LD ₈₄	832,81	LD ₉₀	918,50	
LD ₁₀₀	984,89			

Таблиця 3

Динаміка гематологічних показників у коропа за дворазового введення препарату “Рибохін” у добовій дозі 50,0 мг/кг та 10 мг/кг маси тіла (за ДР) (n = 6; M ± m)

Показники	Група риб	Строки дослідження				
		дві доби	7 діб	14 діб	21 доба	28 діб
гемоглобін, г/л	I група	93,1 ± 3,0	77,7 ± 2,3***	79,4 ± 4,8*	71,3 ± 3,6****	76,7 ± 1,8****
	II група	98,5 ± 3,1	86,3 ± 2,5*	91,5 ± 5,6	96,0 ± 5,7	99,9 ± 1,4
	Контроль	99,5 ± 3,7	92,2 ± 1,5	96,3 ± 5,1	100,2 ± 2,7	101,3 ± 0,9
еритроцити млн./мкл	I група	0,72 ± 0,04	0,75 ± 0,04	0,88 ± 0,03**	0,97 ± 0,05**	0,89 ± 0,03*
	II група	0,74 ± 0,02	0,77 ± 0,02	0,80 ± 0,02	0,79 ± 0,01	0,80 ± 0,02
	Контроль	0,76 ± 0,02	0,78 ± 0,04	0,76 ± 0,01	0,78 ± 0,01	0,78 ± 0,03
лейкоцити тис./мкл	I група	19,80 ± 0,74	19,70 ± 0,52	19,55 ± 0,73	19,50 ± 0,96	19,35 ± 0,57
	II група	19,75 ± 0,48	19,65 ± 0,31	19,90 ± 0,60	20,0 ± 0,71	19,40 ± 0,55
	Контроль	19,55 ± 0,56	19,55 ± 0,51	19,75 ± 0,85	19,80 ± 0,64	19,90 ± 0,59

Примітка: * – різниця вірогідна по відношенню до контрольних значень відповідних показників у цей термін досліджень при * – (P ≤ 0,1); ** – (P ≤ 0,05); *** – (P ≤ 0,01); **** – (P ≤ 0,001)

Дані таблиці 3 свідчать, що при задаванні препарату “Рибохін” у дозі (за ДР) 50,0 мг/кг маси тіла, починаючи з сьомої та по 28-му добу включно, реєстрували вірогідне зниження вмісту загального гемоглобіну в крові риб дослідної групи порівняно з контрольними значеннями показника. Так, на 7-; 14-; 21- і 28-му добу експерименту в крові дослідних риб зниження показника складало 15,7; 17,5; 28,8 і 24,3% (P < 0,05) відповідно.

При цьому варто зазначити, що кількість еритроцитів у крові дослідних риб, починаючи з 14-ї та по 28-му добу включно, вірогідно збільшувалась порівняно з контролем, що в середньому дорівнювало 18,1% (P < 0,05). Отримані результати вказують на наявний вплив препарату на гемопоєз риб, який супроводжувався зменшенням наповнення “червоних” клітин гемом поряд зі зростанням їхньої кількості, що може бути ознакою згущення крові дослідних риб.

Водночас при задаванні “Рибохіну” в дозі (за ДР) 10,0 мг/кг маси тіла протягом всього періоду дослідження

змін гематологічних показників порівняно з контрольною групою риб не реєстрували, лише на сьому добу спостерігали достовірне зменшення вмісту гемоглобіну на 9,4%.

Динаміка біохімічних показників крові та маркерів вродженого імунітету риб наведена у таблиці 4.

Дані, наведені у таблиці 4, свідчать, що у плазмі крові риб I дослідної групи статистичних змін вмісту загальних протеїнів впродовж експерименту не реєстрували. Виняток складала тенденція щодо зниження рівня показника на 21-шу добу після введення препарату. Але введення препарату в токсичній дозі справляло вплив на рівень альбумінів плазми крові риб. Так, на 14-ту і 21-шу добу кількість альбумінів вірогідно знижувалась порівняно з їх контрольним рівнем в середньому на 16,0 і 9,8% (P < 0,05), залишаючись такою за тенденцією й на 28-му добу експерименту, але не вірогідно.

Таблиця 4

Біохімічні показники крові та маркери вродженого імунітету риб за дворазового введення препарату “Рибохін” у добовій дозі 50,0 мг/кг та 10 мг/кг кг маси тіла (за ДР) (n = 6; M ± m)

Показники	Група риб	Строки дослідження				
		дві доби	7 діб	14 діб	21 доба	28 діб
Загальні протеїни, г/л	I група	33,37 ± 0,78	32,05 ± 0,93	32,34 ± 0,71	30,97 ± 0,95	32,01 ± 1,04
	II група	32,37 ± 0,84	33,69 ± 1,27	32,73 ± 0,47	32,82 ± 1,0	33,02 ± 1,03
	Контроль	33,42 ± 1,00	34,21 ± 1,01	33,81 ± 1,14	33,62 ± 1,05	32,62 ± 0,76
Альбуміни, г/л	I група	20,70 ± 0,53	19,09 ± 0,54	17,55 ± 0,59**	17,88 ± 0,42*	17,99 ± 1,0
	II група	20,0 ± 0,21	19,68 ± 0,42	20,0 ± 0,31	18,85 ± 0,84	17,79 ± 0,65
	Контроль	19,60 ± 0,30	20,12 ± 1,28	20,9 ± 1,03	19,83 ± 0,78	19,64 ± 1,04
Глобуліни, г/л	I група	12,67 ± 0,94	12,96 ± 0,82	14,79 ± 1,31	13,10 ± 0,62	14,02 ± 0,80
	II група	12,37 ± 0,64	14,01 ± 1,65	12,73 ± 0,38	13,97 ± 1,13	15,23 ± 1,58
	Контроль	13,82 ± 0,71	14,10 ± 1,88	12,91 ± 0,66	13,79 ± 0,66	12,98 ± 0,84
ЦіК мг/мл	I група	0,115 ± 0,006	0,110 ± 0,004	0,105 ± 0,003**	0,105 ± 0,003*	0,113 ± 0,008
	II група	0,113 ± 0,005	0,113 ± 0,005	0,118 ± 0,005	0,113 ± 0,005	0,115 ± 0,006
	Контроль	0,110 ± 0,004	0,118 ± 0,009	0,120 ± 0,004	0,120 ± 0,004	0,118 ± 0,007
Sm мг/мл	I група	0,18 ± 0,004	0,188 ± 0,004	0,180 ± 0,004	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01
	II група	0,17 ± 0,004	0,17 ± 0,005	0,18 ± 0,004	0,20 ± 0,005	0,198 ± 0,005
	Контроль	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,178 ± 0,005	0,19 ± 0,01	0,193 ± 0,003

Примітка: * – різниця вірогідна по відношенню до контрольних значень відповідних показників у цей термін досліджень при * – (P ≤ 0,1); ** – (P ≤ 0,05); *** – (P ≤ 0,01); **** – (P ≤ 0,001)

Поряд з цим, на 14- і 21-шу добу досліду реєстрували зниження утворення циркулюючих імунних комплексів (ЦіК) середньої молекулярної маси в середньому на 12,5% (P < 0,05) щодо їх контрольних значень, що узгоджується з визначеним типом протеїнограми плазми крові та поряд із зниженням вмісту гемоглобіну вказує на тимчасове пригнічення імунної реактивності в організмі дослідних риб. Встановлені зміни показників наприкінці експерименту мали часткове відновлення.

Зрушення білкового обміну, а також посилення утворення ліпопротеїдів, які є необхідними для відновлення уражених клітинних мембран, показано за дії

низки ксенобіотиків (Al-Akel et al., 2010; Gutty et al., 2017; Khariv et al., 2017).

Інші показники стану неспецифічної резистентності в організмі риб (кількість лейкоцитів та гострофазних протеїнів – серомукоїдів) не набували статистичних змін впродовж експерименту та не відрізнялись від їх контрольного рівня.

Достовірних змін біохімічних показників крові та маркерів вродженого імунітету у риб II дослідної групи, порівняно з контрольною, протягом всього періоду досліджень не реєстрували.

Дані щодо динаміки ензимів та глюкози у плазмі крові коропа за дворазового застосування препарату “Рибохін” наведені у таблиці 5.

Таблиця 5

Динаміка ензимів та глюкози у плазмі крові коропа за дворазового введення препарату “Рибохін” у добовій дозі 50,0 мг/кг та 10 мг/кг маси тіла (за ДР) (n = 6; M ± m)

Показники	група	Строки досліджень				
		дві доби	7 діб	14 діб	21 доба	28 діб
АлАТ, ммоль/год.л	I група	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,003	0,32 ± 0,01**	0,3 ± 0,01*	0,39 ± 0,01
	II група	0,36 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,39 ± 0,04	0,42 ± 0,03	0,40 ± 0,01
	Контроль	0,36 ± 0,003	0,37 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,40 ± 0,04	0,41 ± 0,01
АсАТ, ммоль/год.л	I група	2,69 ± 0,02**	2,69 ± 0,08***	2,58 ± 0,03**	2,29 ± 0,02	2,16 ± 0,04
	II група	2,15 ± 0,02	2,04 ± 0,11	1,82 ± 0,23	2,03 ± 0,08	2,11 ± 0,03
	Контроль	2,13 ± 0,12	2,1 ± 0,06	2,07 ± 0,11	2,11 ± 0,10	2,09 ± 0,09
α-амілаза, мг/сек.л	I група	5,18 ± 0,09	5,09 ± 0,07	5,12 ± 0,08	5,55 ± 0,03****	5,19 ± 0,07
	II група	5,06 ± 0,05	5,07 ± 0,09	4,87 ± 0,19	5,19 ± 0,07	5,07 ± 0,07
	Контроль	4,98 ± 0,03	4,97 ± 0,03	4,97 ± 0,03	5,01 ± 0,02	5,08 ± 0,07
Глюкоза, ммоль/л	I група	4,09 ± 0,04***	3,33 ± 0,08*	3,15 ± 0,05**	3,12 ± 0,03**	3,26 ± 0,09
	II група	3,63 ± 0,07	3,35 ± 0,10	3,45 ± 0,17	3,30 ± 0,10	3,55 ± 0,18
	Контроль	3,56 ± 0,06	3,51 ± 0,03	3,52 ± 0,14	3,57 ± 0,14	3,56 ± 0,13

Примітка: * – різниця вірогідна по відношенню до контрольних значень відповідних показників у цей термін досліджень при * – (P ≤ 0,1); ** – (P ≤ 0,05); *** – (P ≤ 0,01); **** – (P ≤ 0,001)

Як показано в таблиці 5, динаміка глюкози в плазмі крові риб I дослідної групи впродовж експерименту мала коливальний характер. Так, уміст глюкози в

плазмі крові риб дослідної групи через 2 доби після введення препарату зростав у середньому на 14,9% (P < 0,05), через 7 діб – знижувався і не відрізнявся від

контролю, а в наступні терміни досліджень – на 14- і 21-шу добу – вірогідно знижувався в середньому на 10,5 і 12,6% порівняно з контролем. На остаточному терміні досліду – на 28-му добу – рівень глюкози у плазмі крові риб за значенням статистично не відрізнявся від контрольного. При цьому в риб II дослідної групи достовірних змін умісту глюкози в плазмі крові не реєстрували, спостерігалась лише тенденція до його зменшення у період із сьомої до 21-ї доби. Отже, за підсумком отриманих результатів можна припустити, що визначена спочатку експерименту мобілізація енергетичного обміну носить адаптаційний характер, але в подальшому – характеризується компенсаторним витрачанням енергетичних ресурсів, спрямованим на активацію процесів детоксикації внаслідок введення лікарського засобу в токсичній дозі.

Вважають, що величина індукції активності гепатоспецифічних ензимів у крові є пропорційною ступеню руйнування гепатоцитів і активності патологічного процесу (Hazanov, 1988; Bono, 1994; Todoruk et al., 2018).

Введення препарату також справляє вплив на інтенсивність процесів переамінування в печінці та міокарді риб (табл. 5). Так, на 14- і 21-шу добу експерименту в риб I дослідної групи реєстрували вірогідне зниження ензиматичної активності АлАТ у плазмі крові риб в середньому на 15,8 і 25,0% ($P < 0.05$) порівняно з контролем, що узгоджується з динамікою вмісту глюкози та вказує на зниження утворення недоокиснених продуктів у риб, в тому числі – пірувату.

Поряд з цим впродовж експерименту у риб I дослідної групи визначено поступову активацію іншого ензиму – АсАТ, який бере участь у забезпеченні цитоплазми субстратами для глікоконезу при перетворенні пірувату до глюкози (Dirksen et al., 1990). Так, підвищення рівня активності ензиму в плазмі крові дослідних риб на 2-; 7-; 14- і 21-шу добу складало 26,3; 28,1; 24,6 і 8,5% ($P < 0,05$) порівняно з її контрольними значеннями. З одного боку, отримані результати також узгоджуються з динамікою вмісту глюкози, а з іншого – є ознакою ураження паренхіматозних клітин і додаткового навантаження на міокард в організмі дослідних риб.

Зниження вмісту глюкози в плазмі крові риб I дослідної групи на 14- і 21-шу добу після введення препарату, очевидно, відбувається також за участю активності α -амілази, яка на 21-шу добу експерименту за значенням була вірогідно вищою за контрольний рівень ензиму на 10,8%.

Варто зазначити, що, за даними таблиці 5, достовірних змін активності ензимів АлАТ, АсАТ та α -амілази у риб II дослідної групи порівняно з контрольною не реєстрували.

На тимчасове підвищення інтенсивності деструктивних процесів у печінці через можливий розвиток оксидативного стресу за дії препарату в токсичній дозі вказує динаміка утворення продуктів ліпопероксидації – ДК і ТБК (табл. 6).

Таблиця 6

Інтенсивність процесів ліпопероксидації та активність антиокислювальної системи в організмі коропа за дворазового введення препарату “Рибохін” у добовій дозі 50,0 мг/кг та 10 мг/кг маси тіла (за ДР) (n = 6; $M \pm m$)

Показники	група	Строки досліджень				
		дві доби	7 діб	14 діб	21 доба	28 діб
Інтенсивність процесів ПОЛ						
ДК мкмоль/л	I група	32,31 ± 0,86**	32,87 ± 0,47**	38,24 ± 2,31**	33,06 ± 1,51***	27,22 ± 1,63
	II група	25,83 ± 1,34	24,53 ± 1,45	25,61 ± 0,67	25,83 ± 0,50	26,18 ± 0,33
	Контроль	26,02 ± 1,51	25,85 ± 1,67	26,15 ± 0,42	26,31 ± 0,28	25,96 ± 2,08
ТБК ΔД	I група	3,10 ± 0,16**	4,48 ± 0,14**	5,84 ± 0,19	5,86 ± 0,12	6,03 ± 0,58
	II група	5,38 ± 0,14	5,59 ± 0,18	5,60 ± 0,28	5,65 ± 0,26	5,68 ± 0,30
	Контроль	5,64 ± 0,28	5,74 ± 0,27	5,74 ± 0,38	5,80 ± 0,16	5,81 ± 0,41
Активність АОС						
Каталазна активність, ммоль H ₂ O ₂ /г білка у хв.	I група	20,2 ± 0,9	18,5 ± 0,7	19,2 ± 1,0	18,9 ± 0,5	19,8 ± 1,5
	II група	21,9 ± 0,9*	19,1 ± 0,4	19,6 ± 0,6	19,8 ± 0,5	19,8 ± 0,4
	Контроль	19,6 ± 0,7	19,6 ± 0,6	20,1 ± 0,3	19,9 ± 0,6	20,2 ± 0,7
загальна АОА % інгібіції	I група	52,8 ± 6,9	53,9 ± 3,3	48,5 ± 3,7**	43,8 ± 3,1***	50,6 ± 3,3*
	II група	55,8 ± 4,6	57,6 ± 3,0	58,1 ± 0,9	57,9 ± 0,6	58,4 ± 3,6
	Контроль	57,7 ± 4,6	58,6 ± 6,3	58,7 ± 1,1	57,3 ± 0,7	59,1 ± 1,6

У плазмі крові риб I дослідної групи встановлено вірогідне зростання утворення первинних продуктів ПОЛ – ДК, починаючи з другої та 21-ї доби включно (від 24,2 до 46,3%; $P < 0,05$), порівняно з контрольним рівнем показника. Значення показника наприкінці експерименту (через 28 діб) наближались до його контрольного рівня. На цей час (на другу і сьому добу експерименту) реєстрували, навпаки, зниження рівня утворення кінцевих продуктів ПОЛ – ТБК, що у сере-

дньому складало 45,0 і 12,0% ($P < 0,05$) відповідно. Починаючи з 14- та до 28-ї доби включно вміст ТБК у плазмі крові дослідних риб статистично не відрізнявся від його контрольного рівня. У риб як II дослідної, так і контрольної групи змін у динаміці утворення продуктів ліпопероксидації ДК і МДА не реєстрували.

При дослідженні показників антиокислювальної системи (АОС) за впливу препарату в токсичній дозі впродовж експерименту не реєстрували змін рівня

каталазної активності (табл. 6). Інший характер змін мав показник загальної АОА у плазмі крові риб в динаміці експерименту. Внаслідок введення препарату у плазмі крові риб I дослідної групи встановлювали поступове зниження рівня загальної АОА, яке на 14-; 21- і 28-му добу експерименту набувало вірогідних змін і складало в середньому 17,4; 23,6 і 14,4% щодо контролю. У риб II дослідної групи показник загальної АОА у плазмі крові не змінювався.

Таким чином, за дворазового застосування препарату “Рибохін” у добовій дозі (за ДР) 50,0 мг/кг маси тіла наприкінці експерименту (28-ма доба) в організмі риб інтенсивність процесів ПОЛ (за рівнем утворення його первинних і кінцевих продуктів) перебувала на рівні фізіологічного контролю, що, очевидно, відбувається за рахунок компенсаторного витрачання пулу ендогенних структурних антиоксидантів (за зниженням рівня загальної АОА; $P < 0,05$): найменші значення показника фіксували на 21-шу добу досліді. За умов дворазового застосування рибі препарату “Рибохін” у добовій дозі (за ДР) 10,0 мг/кг інтенсивність процесів ПОЛ та активність окислювальної системи порівняно з контролем не змінювались.

Але, варто зазначити, що за дворазового введення препарату у добовій дозі 10,0 мг/кг маси тіла (за ДР), яка є лікувальною при боротьбі з паразитарними хворобами, у динаміці експерименту в крові дослідних риб не виявляли достовірних змін клініко-біохімічних показників.

Висновки

1. Визначено параметри гострої токсичності для коропа LD_{50} хлорохіну становить $528,66 \pm 68,01$ мг/кг; $LD_{16} = 224,512$ мг/кг; $LD_{84} = 832,81$ мг/кг; $LD_{100} = 984,89$ мг/кг маси тіла, які вказують, що препарат є малотоксичним для риб (відноситься до четвертої групи токсичності).

2. Максимальну вираженість метаболічних змін в організмі риб за дворазового застосування препарату “Рибохін” в добовій дозі 50,0 мг/кг маси тіла (за ДР) виявляли на 21-шу добу після останнього задавання. Механізми токсичної дії препарату полягають у перебудовах в протеїнограмі і процесах переамінування та гальмуванні імунної реактивності в організмі дослідних риб, що вказує на превалювання катаболічних процесів над анаболічними. Метаболічні перебудови, очевидно, спрямовані на активацію процесів детоксикації з підвищенням енергетичних затрат в організмі риби внаслідок потрапляння підвищених доз препарату. На 28-му добу експерименту лівова частка досліджених показників за значенням була близькою до їх контрольного рівня.

3. Встановлено, що за дворазового введення препарату у добовій дозі 10,0 мг/кг маси тіла (за ДР), яка є лікувальною при боротьбі із паразитарними хворобами, у динаміці експерименту в крові дослідних риб не виявляли достовірних змін клініко-біохімічних показників.

Перспективи подальших досліджень. Враховуючи отримані результати та дані попередніх досліджень, в подальшому планується впровадження препарату “Рибохін” у практику ветеринарної медицини та рибного господарства для боротьби із захворюваннями риб, спричиненими паразитичними найпростішими (Protozoa) та моногенетичними присиснями (клас Monogenea).

References

- Al-Akel, A.S., Alkahem-Al-Balawi, H.F., Al-Misned, F., Mahboob, S., Ahmad, Z., & Suliman, E.M. (2010). Effects of dietary copper exposure on accumulation, growth, and hematological parameters in *Cyprinus carpio*. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 92, 1865–1878. doi: 10.1080/02772248.2010.486230.
- Bono, D.P. (1994). Free radicals and antioxidants in vascular biology: the roles of reaction kinetics, environment and substrate turnover. *QJM*, 87(8), 445–453. doi: 10.1093/oxfordjournals.qjmed.a068954.
- Demidov, N.V., & Berezkina, S.V. (1986). Metodicheskie rekomendacii po ocenke angel'mintikov v veterinarii. M.: VASHNIL (in Russian).
- Dirksen, G., Gründer, H.-D., Stöber, M. (1990). Die klinische Untersuchung des Rindes. Berlin; Hamburg: Paul Parey, 367–385.
- European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Communities L*. 358. 1986. 1–29.
- Gavrilov, V.B., & Mishkorudnaja, M.I. (1983). Spektrofotometricheskoe opredelenie soderzhaniya gidroperekisej lipidov v plazme krovi. *Lab. delo*, 3, 33–36 (in Russian).
- Gutyj, B., Martyshchuk, T., Bushueva, I., Semeniv, B., Parchenko, V., Kaplaushenko, A., Magrelo, N., Hirkovyy, A., Musiy, L., & Murska, S. (2017). Morphological and biochemical indicators of blood of rats poisoned by carbon tetrachloride and subject to action of liposomal preparation. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(2), 304–309. doi: 10.15421/021748.
- Hazanov, A.I. (1988). Funkcional'naja diagnostika boleznej pecheni. 2 e izd., pererab. i dop. M. : Medicina (in Russian).
- Hemdal, J.F. (2013). Aquarium Fish: Chloroquine: A “New” Drug for Treating Fish Diseases. <https://www.advancedaquarist.com/2013/2/fish>.
- Khariv, M., Gutyj, B., Ohorodnyk, N., Vishchur, O., Khariv, I., Solovodzinska, I., Mudrak, D., Grymak, C., & Bodnar, P. (2017). Activity of the T- and B-system of the cell immunity of animals under conditions of oxidation stress and effects of the liposomal drug. *Ukrainian Journal of Ecology*, 7(4), 536–541. doi: 10.15421/2017_157.

- Klebanov, G.I. (1988). Ocenka antiokislitel'noj aktivnosti plazmy krovi s primeneniem zheltochnyh lipoproteidov. *Lab. delo*, 5, 59–62 (in Russian).
- Kondrahin, I.P. (1985). *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika v veterinarii*. M.: Agropromizdat (in Russian).
- Koroljuk, M.A. (1988). Opredelenie aktivnosti katalaz. *Lab. Delo*, 1, 16–18 (in Russian).
- Kotsiumbas, I.Ia. (2006). *Doklinichni doslidzhennia veterynarnykh likarskykh zasobiv*. Lviv (in Ukrainian).
- Krafts, K., Hempelmann, E., & Skórska-Stania, A. (2012). From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy. *Parasitology Research*, 111(1), 1–6. doi: 10.1007/s00436-012-2886-x.
- Men'shikov, V.V. (1987). *Laboratornye metodicheskie issledovanija v klinike*. M.: Medicina (in Russian).
- Prozorovskij, V.B. (2007). Statisticheskaja obrabotka rezul'tatov farmakologicheskikh issledovanij. *Psichofarmakologija i biol. narkologija*, 7(3–4), 2090–2120 (in Russian).
- Todoriuk, V.B., Hunchak, V.M., Gutyj, B.V., Gufriy, D.F., Hariv, I.I., Khomyk, R.I., & Vasiv, R.O. (2018). Preclinical research of the experimental preparation “Ferosel T”. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*, 1(1), 3–9. doi: 10.32718/ujvas1-1.01.
- Vaziri, A., & Warburton, B. (1994). Slow release of chloroquine phosphate from multiple taste-masked W/O/W multiple emulsions. *Journal of Microencapsulation*, 11(6), 641–648. doi: 10.3109/02652049409051114.
- Vlizlo, V.V. (2012). *Laboratorni metody doslidzen u biolohii, tvarynnytstvi ta veterynarii medytsyni: dovid*. Lviv: Spolom (in Ukrainian).