

УДК 632.954 + 597.551.2:577.124

А. А. Жиденко, Е. В. Бибчук, О. Б. Мехед, В. В. Кривопиша

ВЛИЯНИЕ ГЕРБИЦИДОВ РАЗЛИЧНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ НА УГЛЕВОДНЫЙ ОБМЕН В ОРГАНИЗМЕ КАРПА

Изучены изменения ферментативной активности разных звеньев обмена углеводов в органах двухлеток карпа (*Cyprinus carpio* L.) под действием различных по химической природе гербицидов, что приводит к колебаниям концентрации глюкозы и гликогена в этих органах и влияет на жизнедеятельность рыб.

Ключевые слова: карп, гербициды, глюкоза, гликоген, ферменты углеводного обмена.

С целью повышения урожайности сельскохозяйственных культур увеличивается применение гербицидов на Украине и в других странах. Результатом этого является загрязнение водоемов, степень токсичности воды которых можно установить с помощью рыб в качестве тест-объектов. В организме рыб наиболее быстро на негативное воздействие гербицидов реагируют углеводы, так как они принимают участие в срочной адаптации [3]. Метаболизм углеводов характеризуется быстрыми изменениями показателей в энергетическом и пластическом направлениях обмена веществ. Целью данной работы является исследование изменений углеводного обмена в органах двухлеток карпа (*Cyprinus carpio* L.) в ответ на воздействие гербицидов разной химической природы (зенкор, производные 2,4 дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4-Д), раундап) в концентрации 2 ПДК.

Материал и методика исследований. Исследование влияния гербицидов проведено на двухлетках карпа, выращенных в ОАО «Черниговрыбхоз» с 1990 по 2006 г. Гидрохимический режим прудов, из которых отбирали рыб, и экспериментальные условия в 200-литровых аквариумах не отклонялись от рыбоводно-биологических и гидрохимических норм. Величина рН составляла $7,30 \pm 0,27$, содержание кислорода — $5,6 \pm 0,4$ мг/дм³, температура воды соответствовала естественной. Масса рыб колебалась в пределах 200—300 г. Для проведения эксперимента были взяты 3 гербицида разной химической природы с различными свойствами: зенкор — метрибузин (4-амино-6-третбутил-3(метилтио)-1,2,4-триазин-5(4Н)-он), раундап — глифосат, фосулен (N-фосфонометилглицин, действующее вещество — глифосат входит в состав 22 гербицидов, которые синтезируются в настоящее время в 8 странах мира и разрешены к применению на Украине [2]) и 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота (2,4-Д), а также ее производные — аминная соль

© Жиденко А. А., Бибчук Е. В., Мехед О. Б., Кривопиша В. В., 2009

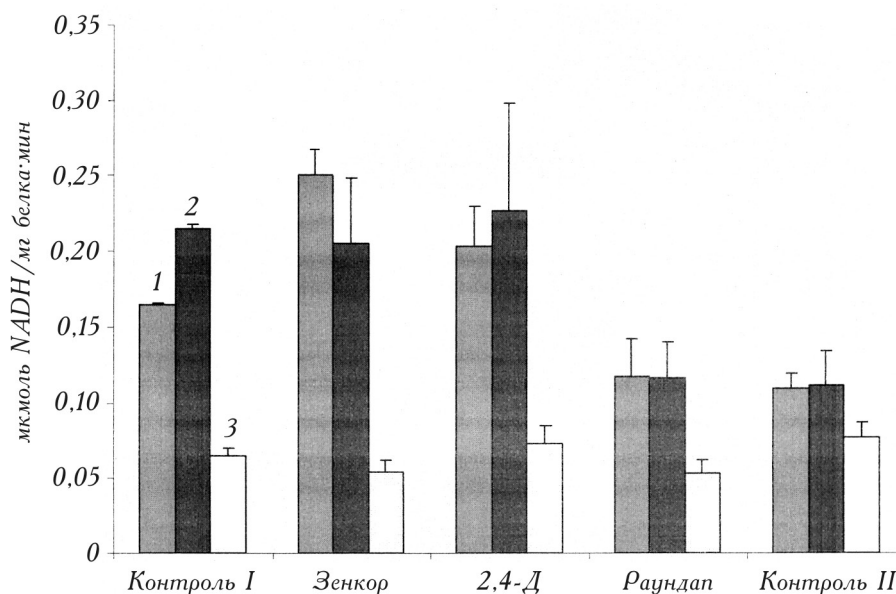
(2,4-ДА), раствор 2,4-Д бутилового эфира (ДБЭ), которые активно применялись в 1970—1980-е годы, их запасы до сих пор хранятся в достаточных количествах, в том числе и в Черниговской области. Кроме того, в качестве действующих веществ они входят в состав 16 гербицидов, производимых в Украине, Китае, Венгрии, Польше, Австрии, Швейцарии, США и применяющихся в Украине в настоящее время [10]. Кровь у рыб брали путем пункции сердца, стабилизировали добавлением гепарина 1000 ед/мл [2]. Активность ферментов определяли в головном мозге, белых мышцах и печени рыб, для чего готовили гомогенат тканей на 0,25 М сахарозе в соотношении 1:10. Ядра, митохондрии и микросомы выделяли по общепринятым методикам [17], с учетом некоторых особенностей фракционирования гомогенатов тканей рыб [15]. Дополнительно митохондрии очищали центрифугированием в градиенте плотности сахарозы 0,32—1,2 моль [5] в горизонтальном роторе при 75000 г на протяжении 60 мин при +4°C.

Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49, Г-6-ФДГ) проводили спектрофотометрически при длине волны 340 нм [14]. Активность выражали в мкмоль NADP/мг белкамин. Активность изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.41, ИЦДГ) определяли в митохондриальной фракции гомогенатов. Ферментную активность выражали в мкмоль NADPH в расчете на 1 мг белка за 1 минуту [14]. Лактатдегидрогеназную (КФ 1.1.1.27, ЛДГ) активность определяли спектрофотометрически по изменению оптической плотности окисления NADH при 340 нм [8]. Активность фермента выражали в мкмоль NADH/мг белка·мин. Активность глюкозо-6-фосфатазы (КФ.3.1.3.9, Г-6-Фаза) определяли в надосадочной фракции гомогенатов вышеуказанных органов [9]. Ферментативную активность выражали в мкмоль неорганического фосфора (P_i) за 1 мин на 1 мг белка. Содержание белка в ферментативных препаратах определяли методом Лоури и др. [16]. Концентрацию глюкозы и гликогена определяли глюкооксидазным методом согласно инструкции к лабораторному набору АО «Реагент» (Украина).

Статистическую обработку данных проводили с помощью Microsoft Excel, достоверность различия между средними арифметическими величинами определяли по *t*-критерию Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считали достоверными при $P < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Изучение воздействия одного гербицида (зенкор) [9] на одно направление углеводного обмена (глюконеогенез) не дает полной картины возможных биохимических изменений в тканях рыб, которые могут быть связаны либо с начинающейся патологией, либо с возможной адаптацией. Чтобы понять влияние химической структуры гербицида на биохимические процессы в органах карпа необходимо использовать наиболее отличающиеся по своей природе гербициды и сравнить ответные реакции рыб на их воздействие. Как нами было ранее установлено, у сеголеток наиболее устойчивым к воздействию гербицидов ферментом является ЛДГ [4], ее активность на 14-е сутки эксперимента в исследуемых органах мало отличалась (тенденция к увеличению) от значений активности фермента у рыб контрольной группы. То же явление мы наблюдаем и для двухлеток карпа (рис. 1), особенно в печени: контроль — $0,215 \pm 0,003$; зенкор — $0,205 \pm 0,043$; 2,4-ДА — $0,227 \pm$



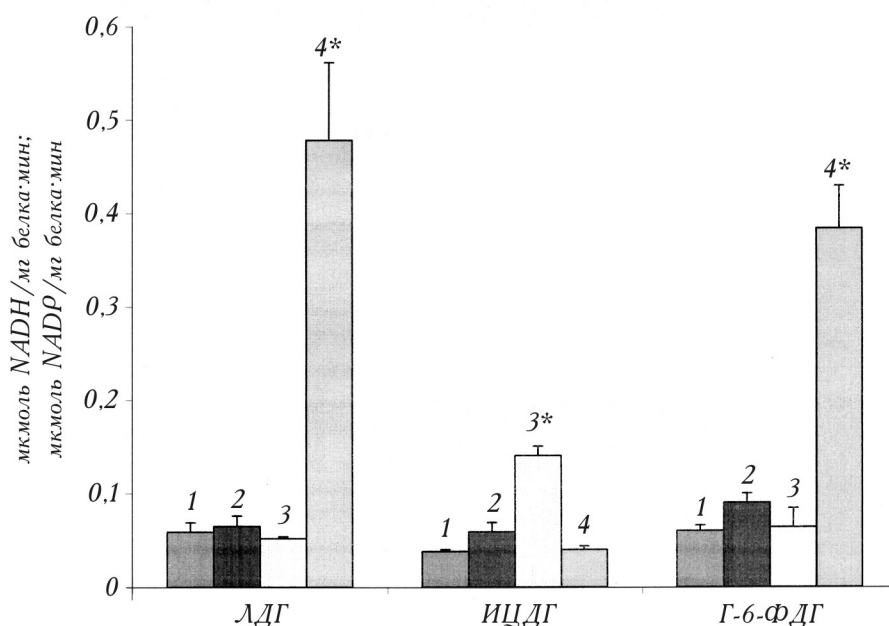
1. Изменения лактатдегидрогеназной активности в органах двухлеток карпа в условиях гербицидной нагрузки: 1 — мышцы; 2 — печень; 3 — мозг. Здесь и на рис. 2—8: $M \pm m$, $n = 6$, * — различия между группами достоверны при $P < 0,05$.

0,071; раундап — $0,116 \pm 0,024$, при контроле — $0,111 \pm 0,024$ мкмоль NADH/мг белка·мин.

Различия в показателях недостоверны, что свидетельствует о стойкости данного фермента к воздействию гербицидов независимо от их химического состава. Некоторое увеличение активности этого фермента под действием зенкора в мышцах двухлеток коррелируют с таковым в мышцах сеголеток [4]. Исключением, а правильнее немедленной ответной реакцией на воздействие раундапа, можем считать увеличение активность ЛДГ в 8,2 раза в жабрах (рис. 2).

Как известно, жабры рыб принимают на себя первый «удар», вызванный химическими изменениями в водной среде, что часто адекватно отражается на биохимических показателях в этом органе. В нашем случае активность ЛДГ незначительно уменьшилась только под действием 2,4-ДА. Как было показано [1], при хронических воздействиях абиеитиновой кислоты в жабрах радужной форели также уменьшилась активность изоферментов лактатдегидрогеназы группы «С». Активность других исследуемых ферментов катаболизма в условиях гербицидной нагрузки в жабрах возросла под действием раундапа глюкозо-6-фосфатдегидрогеназная — в 6,4 раза и под действием 2,4-ДА изоцитратдегидрогеназная — в 3,7 раза (см. рис. 2).

Пентозофосфатный шунт, называемый также фосфоглюконатным путем, поставляет в ткани животных два специальные продукта: NADH и рибозо-5-фосфат. NADH является одним из восстановленных коферментов [6]. Особенно эта функция важна в печени, где протекает активный биосин-

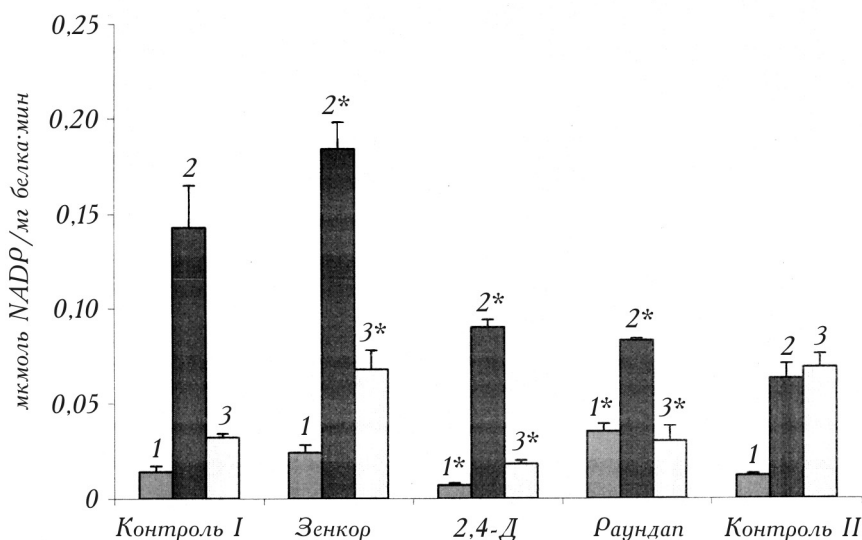


2. Изменения активности ферментов углеводного обмена в жабрах двухлеток карпа в условиях гербицидной нагрузки: 1 — контроль I; 2 — зенкор; 3 — 2,4-Д, 4 — раундап.

тез жирных кислот и стероидов из малых молекул-предшественников. При биосинтезе жирных кислот восстановительная способность в форме NADH требуется для восстановления двойных связей в молекулах, играющих в этом процессе роль промежуточных продуктов. В тех тканях, в которых биосинтез жирных кислот практически не происходит, например в скелетных мышцах, активность пентозофосфатного пути выражена слабо. Подтверждением этого являются данные, приведенные на рисунке 3: минимальные значения активности Г-6-ФДГ в белых мышцах (по сравнению с печенью), причем под действием 2,4-ДА уровень активности снижается в 2 раза, под действием зенкора и раундапа несколько увеличивается. Возможно потому, что другая функция этого пути заключается в образовании пентоз (в частности, D-рибозы), которые используются для синтеза нуклеиновых кислот, необходимых при биосинтезе белка для обновления структуры органа в процессе долговременного этапа адаптации.

Изменения изоцитратдегидрогеназной активности под действием раундапа несколько иные: только в печени наблюдаем возрастание активности этого фермента в 2 раза, в мышцах — снижение в 5,2 раза и в мозге — практически одинаковый уровень (рис. 4).

Под действием зенкора происходит увеличение активности ИЦДГ в мышцах в 2,6, в печени в 1,6 раза, активности 2,4-ДБЭ — в белых мышцах в 1,8, в печени в 1,9 и в мозге в 1,3 раза (см. рис. 4). Эти результаты обусловлены усилением энергетического обмена. Скорость гликолиза в нормальных условиях согласована со скоростью функционирования цикла лимонной кислоты: в клетке до пирувата расщепляется ровно столько глюкозы, сколь-



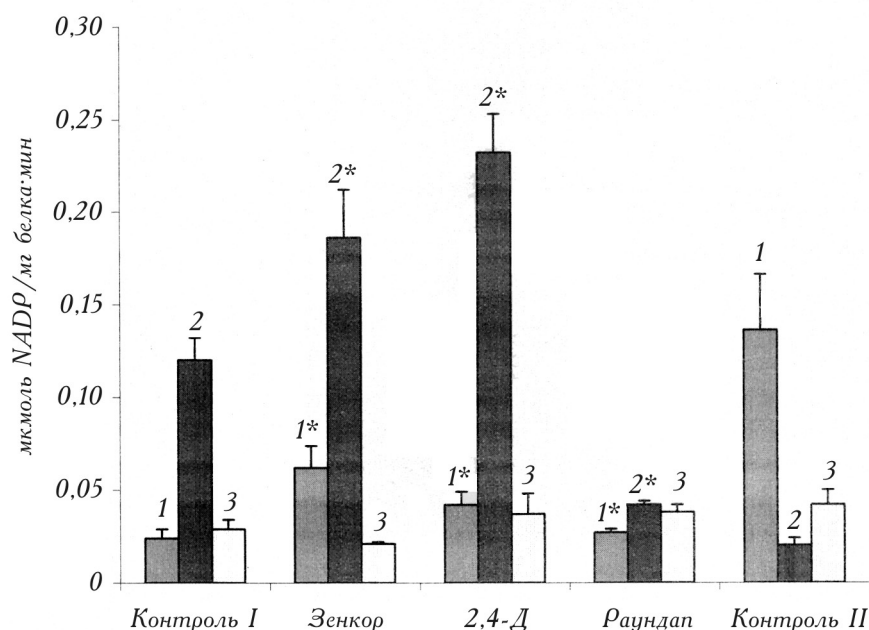
3. Изменения глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной активности в органах двухлеток карпа в условиях гербицидной нагрузки: 1 — мышцы; 2 — печень; 3 — мозг.

ко необходимо для того, чтобы обеспечить цикл лимонной кислоты «топливом» [6]. Согласованность между скоростью гликолиза и скоростью функционирования цикла лимонной кислоты объясняется тем, что первый ингибируется высокими концентрациями АТФ и NADH, то есть компонентами, общими для гликолитической и дыхательной стадий окисления глюкозы; в то же время определенную роль в этой согласованности играет и концентрация цитрата [6].

Производные 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, которые были использованы в эксперименте, 2,4-Д аммонийная соль и 2,4-Д бутиловый эфир в растениях приводят к снижению содержания моносахаридов вследствие угнетения ферментных систем растительных клеток [11] и нарушения процесса окислительного фосфорилирования у сорных растений. Действие гербицидов в исследуемых тканях приводит к противоположным последствиям: так в печени карпа увеличивается активность митохондриальной ИЦДГ — в 1,9 раза, а Г-6-Фазы — более чем в 5 раз (рис. 5) и только активность Г-6-ФДГ снижается в 1,6 раза. Однако при этом наблюдается снижение концентрации глюкозы в мозге и печени под действием всех исследуемых гербицидов (рис. 6, 7).

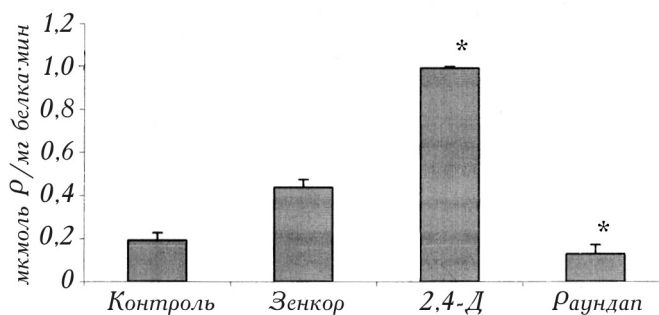
В крови уровень глюкозы практически одинаков, а в белых мышцах отмечено увеличение количества данного метаболита соответственно на 3,4, 3,1 и 14,7% (см. рис. 6). В печени под действием 2,4-ДБЭ происходит снижение содержания субстратов: глюкозы — на 16% (см. рис. 7), гликогена — на 18% (рис. 8)

Эти данные свидетельствуют о протекании механизма биохимической адаптации первого типа, который был назван П. Хочачкой и Дж. Сомеро



4. Изменения изоцитратдегидрогеназной активности в органах двухлеток карпа в условиях гербицидной нагрузки: 1 — контроль I; 2 — зенкор; 3 — 2,4-Д, 4 — раундап, 5 — контроль II.

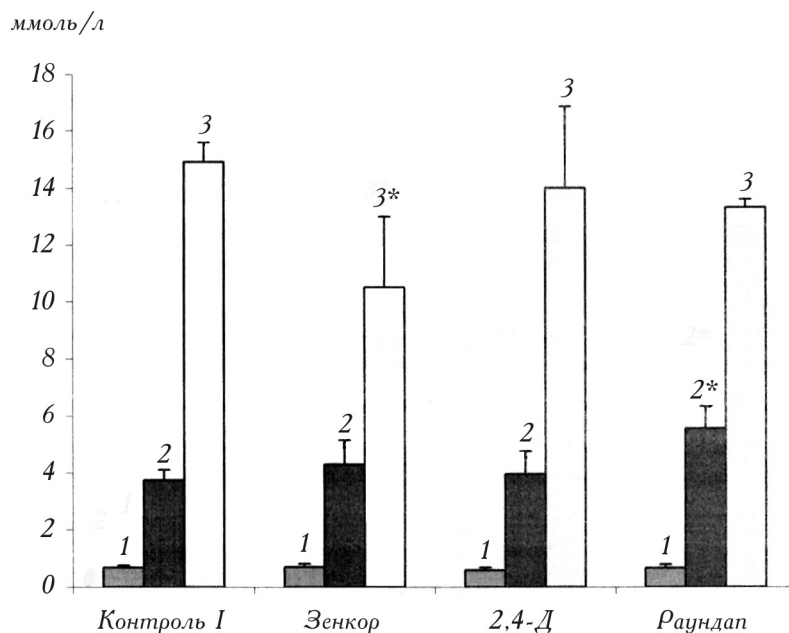
[13] «количественной стратегией», когда организм реагирует на действие токсиантов функционально, без качественных перемен, на уровне срочной адаптации.



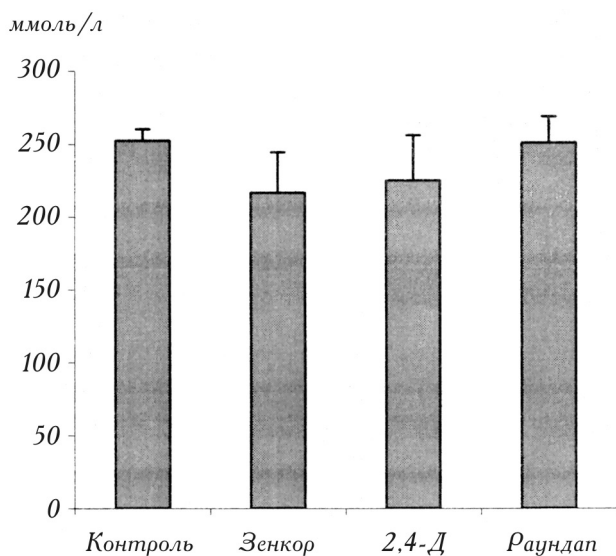
5. Изменения глюкозо-6-фосфатазной активности в печени двухлеток карпа в условиях гербицидной нагрузки.

Биохимические изменения в органах рыб под действием гербицидов влияют на гистологические параметры двухлеток карпа.

Наименее выражены патологические изменения жабр под действием раундапа, наивысшая активность изученных ферментов также в жабрах и также под действием раундапа. Активность ЛДГ увеличилась в 8 раз, активность Г-6-ФДГ — в 6,4 раза, активность ИЦДГ осталась без изменений. Под действием 2,4-ДА средняя выраженность патологии органа, а изоцитратдегидрогеназная активность — наивысшая, в 3,7 раза превышает активность того же фермента в жабрах контрольных рыб. Ответная реакция на действие зенкора слабо выражена, возможно, потому, что патологические изменения максимальны (таблица).



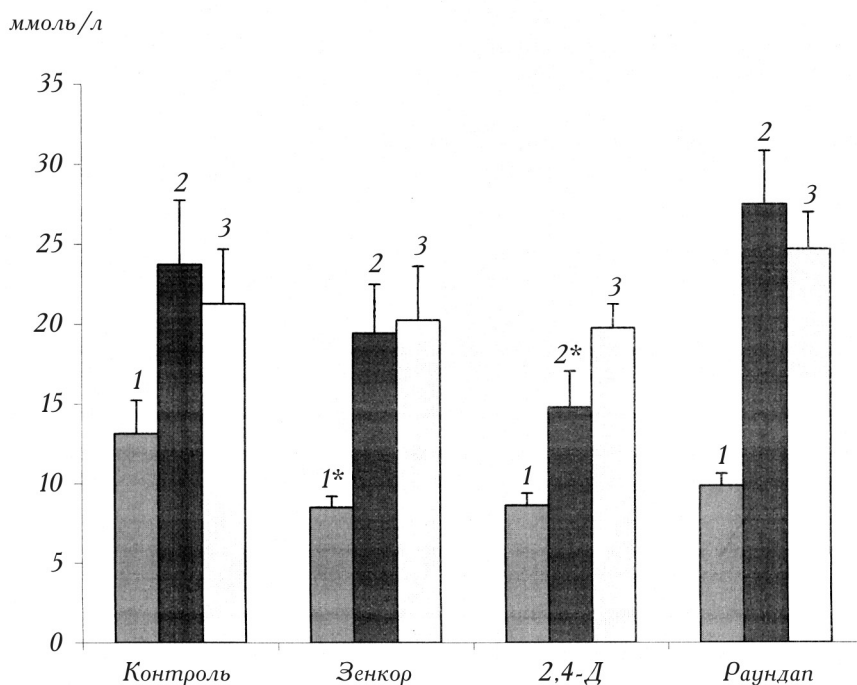
6. Содержание глюкозы в органах двухлеток карпа в условиях гербицидной нагрузки: 1 — мышцы; 2 — печень; 3 — мозг.



7. Содержание глюкозы в печени двухлеток карпа в условиях гербицидной нагрузки.

Гербициды наибольшее негативное влияние оказали на печень, как орган, обеспечивающий процесс детоксикации. Интересные изменения наблюдаются на биохимическом уровне под действием 2,4-ДА: глюкозо-6-фосфотазная активность максимальна, а под действием раундапа — минимальна (см. рис. 5). Возможно, это связано с химическими свойствами гербицидов: раундап — водорастворимый, быстрее проникает в клетку и ингибирует работу цитоплазматического фермента, а 2,4-ДА — растворим только

в органических растворителях, достигая клетки, инициирует синтез этого фермента для активизации процесса глюконеогенеза.



8. Содержание гликогена в органах двухлеток карпа в условиях гербицидной нагрузки.

Таким образом, можно предположить, что нарушение одного уровня организации — тканевого, может привести к активации процесса адаптации на другом — биохимическом. Ту же закономерность можно проследить в мышечной ткани, когда разрушение мышечных волокон под действием раундапа приводит к увеличению количества водорастворимых белков — ферментов. В мышцах и печени под действием раундапа происходит незначительное увеличение активности ЛДГ и значительное — Г-6-ФДГ (в 2,9 раз в мышцах, в 1,3 раза в печени) (см. рис. 3).

Степень выраженности гистологических изменений в органах двухлеток карпа при воздействии гербицидов

Органы	Гербициды		
	2,4-ДА	зенкор	раундап
Печень	+++	++	+++
Мышцы	++	+	++
Жабры	++	+++	+
Кишечник	—	—	—
Мозг	++	+	+

Примечание. «—» — особых изменений не выявлено; «+» — изменения слабо выражены; «+++» — средне выраженные изменения; «++++» — сильно выраженные изменения.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют об изменении направленности метаболических процессов в соответствии с потребностями организма. В условиях гербицидной нагрузки преимущественным направлением углеводного обмена для потребностей организма является глюконеогенез, основная функция которого — синтез глюкозы из неуглеводных компонентов. Она необходима в качестве основного питательного субстрата для мозга. Если концентрация глюкозы в мозге даже на короткое время оказывается существенно ниже определенного критического уровня, то могут возникнуть тяжелые, иногда необратимые, нарушения его функций. Глюкоза используется мозгом в процессе гликолиза с последующим окислением образованных метаболитов в цикле трикарбоновых кислот, окисление глюкозы обеспечивает почти весь запас АТФ мозга. Подтверждением вышесказанного являются данные, приведенные на рисунках 1 и 4, которые отражают увеличение активности цитоплазматической ЛДГ, митохондриальной ИЦДГ в мозге и белых мышцах в условиях гербицидной нагрузки по сравнению с контролем.

Количество глюкозы изменяется незначительно (см. рис. 6, 7), поддерживая гомеостаз организма, а количество гликогена снижается, за исключением действия раундапа (см. рис. 8) в печени и мозге. Главная роль пентозофосфатного пути преобразования углеводов — образование восстановленных NADP-зависимых коферментов (NADPH) для биосинтеза жирных кислот, а также для постоянного пополнения пула пентоз. Увеличение активности Г-6-ФДГ под действием зенкора происходит в качестве адаптивной реакции для увеличения синтеза пентоз (рибозы и дезоксирибозы), поскольку данный гербицид приводит к нарушению обмена нуклеиновых кислот [12]. Под действием 2,4-ДА, наоборот, наблюдается снижение активности данного фермента, поскольку адаптивной реакцией на действие указанного гербицида является поддержание определенного уровня глюкозы для питания мозга и белых мышц.

Более заметные изменения ферментативной активности углеводного метаболизма в тканях карпа происходят под действием производных 2,4-Д, что можно объяснить исходя из их химического строения. Собственно сама 2,4-Д кислота и ее бутиловый эфир относятся к группе наиболее стабильных веществ, (константа накопления составляет 201-1000) — это III группа по накоплению [12], высокая стабильность обеспечивается наличием бензольного кольца. Сравнимая способность к кумуляции в тканях рыб разных форм гербицида 2,4-Д с одинаковыми концентрациями, можно утверждать, что наибольший коэффициент накопления имеет 2,4-Д бутиловый эфир [8]. Возможно, это обусловлено специфичностью построения молекулы эфира, которая обеспечивает ему проникновение через внешние покровы тела животных. Высокие накопительные свойства эфира объясняются функциональной кумуляцией [12]. Кумулятивные свойства зенкора выражены слабо [7].

На данный момент из гербицидов наиболее широко применяется раундап, действующим веществом которого является глифосат (N-фосфометил глицин), который ингибирует в растениях ферменты, обеспечивающие синтез трех ароматических аминокислот [14]. В животных тканях глифосат ингибирует ферменты анаболического (Г-6-Фаза, см. рис. 5) направления обмена веществ. В отношении активности других ферментов наблюдается тканевая специфичность: в

гепатоцитах достоверно увеличивается уровень активности ИЦДГ и Г-6-ФДГ, в мозге же, наоборот, наблюдается снижения активности ЛДГ, ферментов цикла Кребса и пентозофосфатного пути, а для белых мышц достоверно увеличивается лишь уровень Г-6-ФДГ-ной активности. Функционирование ЛДГ наиболее стабильно, поддерживается практически на одном уровне. Увеличение активности ферментов под действием глифосата можно отнести к адаптивным перестройкам метаболических путей для обеспечения гомеостаза и энантиостаза в ответ на действие гербицидов.

Изменения направленности реакций углеводного обмена в исследованных органах двухлеток карпа зависят от химического строения гербицида. Действие зенкора приводит к росту активности Г-6-ФДГ (пентозофосфатный путь) для увеличения пула пентоз. Действие гербицидов группы 2,4-Д в первую очередь вызывает увеличение активности Г-6-Фазы (глюконеогенез) для поддержания нормального уровня глюкозы в органах карпа. Действие раундапа ингибирует активность глюкозо-6-фосфатазы и приводит к некоторому увеличению активности ЛДГ (гликолиз) и митохондриальной ИЦДГ (цикл Кребса) для поддержания необходимого уровня АТФ в организме рыб. Наименьшие изменения активности ферментов под действием гербицидов (независимо от их химического строения) характерны для ЛДГ всех исследуемых тканей, за исключением жабр карпа.

**

Показано зміну реакцій вуглеводного обміну в тканинах коропа у відповідь на дію гербицидів, різних за структурою, у кількості 2 ГДК (гранично допустимих концентрацій). Зенкор викликає зростання активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (пентозо-фосфатний шлях) для збільшення пулу пентоз і відновлених коферментів $NADH+H^+$. Гербициди групи 2,4-Д (дихлорфеноксіоцтової кислоти) зумовлюють зростання активності глюкозо-6-фосфатази (глюконеогенез) для підтримки нормального рівня глюкози в органах коропа. Раундап інгібує активність глюкозо-6 фосфатази, але децю збільшує активність лактатдегідрогенази і ферментів циклу Кребса для підтримки необхідного рівня АТФ у тканинах рыб. Зміна ферментативної активності вуглеводного обміну під дією гербицидів спричинює зміну концентрації глюкози і глікогену.

**

Change of carbohydrate exchange reactions in tissues of carp in reply to action of various herbicides in quantity 2 EAC (extremely allowed concentration) is shown. The action of zencor is directed on growth of activity glucose-6-phosphatdehidrogenasa (pentozo-phosphatic way) for increasing the quantity of pentozes and restored coenzymes $NADH+H^+$. Action of herbicides of group 2,4-D (dichlorphenoxyacid), results in growth of glucose-6-phosphatase activity (gluconeogenesis) for maintenance of glucose normal level in organs of carp. Round-up action causes inhibition of fermentative activity glucose-6-phosphatase, but some increase in lactatdehidrogenase activity and enzymes of Krebs cycle for maintenance of necessary level ATP in tissues of fishes. Change of fermentative activity of carbohydrates exchange under action of herbicides results in changes of concentration of glucose and glycogen.

**

1. Груздев А.И., Сигоров В.С. Регуляция гликолиза изоферментами лактатдегидрогеназы в тканях радужной форели при влиянии абиетиновой кис-

- лоты // Физиология и биохимия гидробионтов. — Ярославль: Изд-во Ярослав. ун-та, 1987. — С. 12—18.
2. *Давыдов О.Н., Темниханов Ю.Д., Куровская Л.Я.* Патология крови рыб. — Киев: ИНКОС, 2006. — 206 с.
 3. *Жигенко А.А., Кривопиша В.В.* Метаболические адаптации сеголеток и двухлеток карпа к условиям зимовки // Гидробиол. журн. — 2004. — Т. 40, № 5. — С. 42—48.
 4. *Жигенко А.А., Мехег О.Б., Бибчук Е.В.* Зависимость показателей углеводного обмена в тканях карпа от действия гербицидов различной химической структуры // Биология XXI століття: теорія, практика, викладання: Матеріали міжнар. наук. конф. — К.: Фітосоціоцентр, 2007. — С. 51—52.
 5. *Зинич В.Н.* Метод измерения 2-оксиглутаратдегидрогеназной активности интактных митохондрий // Укр. биохим. журн. — 1986. — Т. 58, № 2. — С. 73—77.
 6. *Ленинджер А.А.* Основы биохимии. — М.: Мир, 1985. — 368 с.
 7. *Методичні вказівки з визначення мікрокількостей пестицидів в продуктах харчування, кормах та навколишньому середовищі.* — К.: Нац. аграр. ун-т України, 2004. — № 39. — 252 с.
 8. *Мехег О.Б.* Вплив пестицидного забруднення водного середовища на іхтіологічні показники та метаболічні перетворення в організмі коропа: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 2005. — 20 с.
 9. *Мехег О.Б., Яковенко Б.В., Жигенко А.О.* Вплив зенкору на вміст глюкози та активність ферментів глюконеогенезу в тканинах коропа лускатого (*Surpinus carpio* L.) при різних температурах // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 3. — С. 110—113.
 10. *Перелік пестицидів і агрохімікатів дозволених до використання в Україні:* Практ. довід. для фахівців сільського господарства. — Дніпропетровськ: Арт-Прес, 2006. — 319 с.
 11. *Протасов Н.И.* Гербициды в интенсивном земледелии: Уч. пособие. — Минск: Урожай, 1988. — 232 с.
 12. *Справочник по пестицидам: гигиена применения и токсикология:* 3-е изд., испр. и доп. / Под. ред. А. В. Павлова. — Киев: Урожай, 1986. — 432 с.
 13. *Хочачка П., Сомеро Д.* Биохимическая адаптация. — М.: Мир, 1988. — 568 с.
 14. *Biochemica information.* — Western Germany: Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, 1975. — Bd. 1. — 165 p.; Bd. 2. — 167 p.
 15. *Casey C.A., Anderson P.M.* Subcellular location of glutamine syntetase and urea cycle enzymes in liver of Spiny Dogfish (*Squalus acanthias*) // J. Biol. Chem. — 1982. — Vol. 257, N 14. — P. 8449—8453.
 16. *Lowry O.H., Rosebrough N.I. Farr A.I., Rendall R.I.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Т. 193, N 1. — P. 265—275.
 17. *Schachman H.K.* Ultracentrifugation in Biochemistry. — New York: Acad. press, 1959. — 356 p.