

УДК 577.151.63+574(64+52)

О. Б. Мехед, Б. В. Яковенко, Е. В. Искевич

**СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ТОКСИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ
ГЕРБИЦИДОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ
КОНЕЧНЫХ РЕАКЦИЙ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА И
СОДЕРЖАНИЕ ГЛЮКОЗЫ В ТКАНЯХ КАРПА**

Изучены изменения активности ферментов конечных реакций глюконеогенеза и содержание глюкозы в печени, мышцах и мозге двухлеток карпа (*Cyprinus carpio* L.) при воздействии гербицидов зенкора и 2,4-ДА.

Ключевые слова: карп чешуйчатый, зенкор, 2,4-ДА, ферменты, глюконеогенез, глюкоза.

Хозяйственная деятельность человека приводит к возрастанию концентрации пестицидов в поверхностных водах, часто до опасных для водных организмов и человека уровней. Это вызывает беспокойство и необходимость изучения физиологических и биохимических показателей жизнедеятельности гидробионтов, в частности рыб, в условиях интоксикации.

Целью исследования было установление сезонных изменений активности ферментов конечных реакций глюконеогенеза и содержания глюкозы в мозге, печени и белых мышцах карпа при токсическом влиянии гербицидов 2,4-ДА (диметиламинная соль 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты) и зенкора (метрибузин, действующее вещество — 4-амино-6-трет-бутил-3-метилсульфанил-1,2,4-триазин-5-он).

Материал и методика исследований. Исследования проводились на протяжении года на двухлетках карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio* L.) массой 200—250 г. Рыб отбирали из естественного водоема (зимовальный пруд Черниговского рыбокомбината). В течение всего периода исследований гидрохимический режим контролировали с помощью прибора Horiga модели U-7 (Япония). Содержание кислорода в воде прудов колебалось в пределах 9,6—12,5 мг/дм³, рН — 7,4—8,4, содержание аммиака — 0,014 мг/дм³. Условия содержания не вызвали развития гипоксии, гиперкапнии, гипотермии. По данным ихтиопатологических наблюдений возбудителей кожных паразитических болезней и ленточных паразитов не обнаружено.

Опыты по изучению влияния пестицидов проводили в аквариумах объемом 200 дм³ с отстоянной водопроводной водой, в которые помещали рыбу

© О. Б. Мехед, Б. В. Яковенко, Е. В. Искевич, 2019

из расчета один экземпляр на 40 дм³ воды. Значение рН составляло $7,30 \pm 0,27$, содержание кислорода — $5,6 \pm 0,4$ мг/дм³, температуру поддерживали близкой к естественной в зависимости от времени года. Длительность эксперимента составляла 14 суток.

Концентрацию исследуемых пестицидов (0,2 мг/дм³, что соответствует 2 ПДК для 2,4-Д аминной соли) создавали путем внесения расчетных количеств 40%-ного водного раствора 2,4-Д-аминной соли (2,4-ДА). Концентрация зенкора составляла 0,2 мг/дм³ (2 ПДК) и достигалась внесением расчетного количества 70%-ного порошка зенкор.

Содержание глюкозы определяли фотометрическим методом, измеряя интенсивность цветной реакции с о-толуидиновым реактивом [3]. Для определения активности ферментов готовили гомогенат тканей на 0,2 М сахарозе в соотношении 1 : 10. Ядра, митохондрии и микросомы выделяли по общепринятым методикам [21] с учетом некоторых особенностей фракционирования гомогенатов тканей рыб [1, 16].

Для определения возможности образования в организме карпа глюкозы из неуглеводных компонентов исследовали конечные реакции глюконеогенеза. Активность глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Фаза) и фруктозо-1,6-дифосфатазы (Ф-1,6-Дфаза) определяли в надосадочной фракции гомогенатов исследованных органов, полученной после отделения ядер и обломков клеток (600 г, 15 мин) и митохондрий (15000 г, 25 мин). Об активности указанных ферментов судили по количеству образованного ортофосфата [11]. Реакционная смесь для определения Г-6-Фазы состояла из 0,3 см³ 0,087 М цитратного буфера с рН = 6,5, 0,1 см³ глюкозо-6-фосфата, через 3 мин преинкубации добавляли 0,2 см³ исследуемого ферментного препарата и инкубировали 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 см³ 10%-ной ТХУ и ставили на лед. Через 5 мин полученную смесь разводили дистиллированной водой до 2,5 см³ и осадок белка отделяли центрифугированием. В полученном супернатанте определяли содержание неорганического фосфора. Для установления активности Ф-1,6-Дфазы инкубационная смесь состояла из 0,5 см³ 0,2 М трис НСl буфера рН 7,5, 0,3 см³ 0,1 М MgCl₂, 0,15 см³ фруктозо-1,6-дифосфата. Контролем была проба, в которую ТХУ добавляли до начала реакции. Количественно ортофосфат определяли по [17]. Ферментативную активность выражали в мкмоль неорганического фосфора (P_i) за 1 мин на 1 мг белка. Белок определяли по методу Лоури [18].

Различия между сравниваемыми группами считали достоверными при $P < 0,05$. Корреляционный анализ и однофакторный дисперсионный анализ проводили согласно методическим рекомендациям [6].

Результаты исследований и их обсуждение

Содержание глюкозы во всех органах согласуется с данными литературных источников [8, 13, 19] о максимальном содержании глюкозы и гликогена в тканях пресноводных рыб (леща, карпа) зимой [5], из чего можно сделать вывод о зависимости содержания углеводов в тканях от вида рыб и экологических условий. При воздействии гербицидов отмечена общая тенден-

1. Содержание глюкозы в органах карпа при воздействии пестицидов
(мкмоль/г ткани, $M \pm m$, $n = 5$)

Органы	Месяцы	Контроль	2,4-ДА		Зенкор	
		$M \pm m$	$M \pm m$	P	$M \pm m$	P
Печень	Октябрь	66,48 ± 4,18	31,14 ± 4,10	< 0,001	44,87 ± 9,38	< 0,100
	Январь	110,31 ± 9,10	52,11 ± 0,90	< 0,001	58,14 ± 8,12	< 0,010
	Апрель	8,40 ± 0,90	4,14 ± 0,98	< 0,020	4,60 ± 0,88	< 0,020
	Июль	20,12 ± 2,24	8,12 ± 3,12	< 0,020	12,31 ± 3,33	< 0,100
Белые мышцы	Октябрь	4,18 ± 0,84	2,90 ± 0,50	< 0,500	3,14 ± 0,59	< 0,500
	Январь	32,11 ± 4,12	14,18 ± 0,99	< 0,010	18,03 ± 4,80	< 0,100
	Апрель	3,81 ± 0,10	2,14 ± 0,12	< 0,001	2,10 ± 0,31	< 0,001
	Июль	8,11 ± 0,83	4,54 ± 0,90	< 0,020	3,54 ± 0,42	< 0,010
Мозг	Октябрь	4,96 ± 0,83	2,17 ± 0,09	< 0,020	3,18 ± 0,90	< 0,200
	Январь	33,14 ± 6,16	12,38 ± 0,98	< 0,020	18,30 ± 1,70	< 0,050
	Апрель	3,23 ± 0,63	1,11 ± 0,04	< 0,010	3,12 ± 0,40	< 0,500
	Июль	5,12 ± 1,10	2,13 ± 0,08	< 0,050	3,44 ± 0,54	< 0,500

ция к уменьшению содержания глюкозы во всех исследуемых тканях, что также согласуется с данными литературных источников [12]. В зависимости от токсиканта, времени года и исследуемого органа ее количество на грамм ткани уменьшалось от 1,33 раза (белые мышцы под действием зенкора в октябре) до 2,91 раза (в мозге, под действием 2,4-ДА в апреле) по сравнению с контролем (табл. 1).

Анализ изменения содержания глюкозы в органах карпа в течение года при воздействии 2,4-ДА показал, что максимальному влиянию подвергался мозг. Минимальное токсическое воздействие гербицида наблюдалось в октябре (снижение содержания глюкозы в 2,29 раза, $P < 0,02$), максимальное — в апреле (2,91 раза, $P < 0,01$). В печени в токсических условиях содержание глюкозы также достоверно снижалось, минимальное отмечено летом ($8,12 \pm 3,12$ по сравнению с $20,12 \pm 2,24$ мкмоль/г ткани в контроле, $P < 0,02$). С понижением температуры окружающей среды токсическое влияние

2. Активность Г-6-Фазы в органах карпа при воздействии пестицидов (нмоль НАДФН/мг белка·мин, $M \pm m$, $n = 5$)

Органы	Месяцы	Контроль	2,4-ДА		Зенкор	
		$M \pm m$	$M \pm m$	P	$M \pm m$	P
Печень	Октябрь	0,231 ± 0,003	0,964 ± 0,023	< 0,001	0,062 ± 0,012	< 0,001
	Январь	0,684 ± 0,084	1,012 ± 0,050	< 0,020	0,434 ± 0,012	< 0,050
	Апрель	0,183 ± 0,034	0,314 ± 0,011	< 0,020	0,437 ± 0,037	< 0,010
	Июль	0,106 ± 0,015	0,200 ± 0,011	< 0,001	0,084 ± 0,005	< 0,200
Белые мышцы	Октябрь	0	0,190 ± 0,014	< 0,001	0,180 ± 0,013	< 0,001
	Январь	0,140 ± 0,010	0,236 ± 0,010	< 0,001	0,120 ± 0,011	< 0,001
	Апрель	0,091 ± 0,002	0,284 ± 0,011	< 0,001	0,172 ± 0,012	< 0,001
	Июль	0,070 ± 0,003	0,08 ± 0,010	< 0,200	0,060 ± 0,005	< 0,010
Мозг	Октябрь	0,046 ± 0,003	0,120 ± 0,014	< 0,001	0,020 ± 0,002	< 0,001
	Январь	0,102 ± 0,030	0,406 ± 0,044	< 0,001	0,084 ± 0,004	< 0,020
	Апрель	0,031 ± 0,001	0,200 ± 0,006	< 0,001	0,060 ± 0,016	< 0,100
	Июль	0,017 ± 0,001	0,021 ± 0,004	< 0,200	0,015 ± 0,001	< 0,200

2,4-ДА на печень ослабевало. Наименьшему воздействию гербицида подвергались белые мышцы (содержание глюкозы в октябре, январе, апреле и июле снижалось соответственно в 1,44, 2,26, 1,78 и 1,79 раза).

Влияние зенкора на содержание глюкозы было менее выраженным, чем 2,4-ДА, хотя также в значительной мере зависело от органа и времени года. Наименьшие изменения отмечены в мозге — достоверные различия отмечены лишь в январе ($18,3 \pm 1,70$ против $33,14 \pm 6,16$ мкмоль/г ткани, $P < 0,05$). Содержание глюкозы в мышцах и печени снижалось от 1,33 до 1,90 раза.

Известно, что адаптационный механизм поддержания содержания глюкозы в тканях рыб осуществляется за счет глюконеогенеза, гликогенолиза и межтканевого переноса, но исследования двух последних путей не проводили, поскольку содержание гликогена в исследованных тканях осенью невысокое [14, 23], а в условиях эксперимента проникновение глюкозы в орга-

3. Активность Ф-1,6-ДФазы в органах карпа при воздействии пестицидов (нмоль НАДФН/мг белка за мин, $M \pm m$, $n = 5$)

Органы	Месяцы	Контроль	2,4-ДА		Зенкор	
		$M \pm m$	$M \pm m$	P	$M \pm m$	P
Печень	Октябрь	0,180 ± 0,032	0,290 ± 0,020	< 0,020	0,084 ± 0,054	< 0,200
	Январь	0,360 ± 0,060	0,873 ± 0,015	< 0,050	0,114 ± 0,011	< 0,010
	Апрель	0,170 ± 0,018	0,214 ± 0,011	< 0,001	0,438 ± 0,084	< 0,020
	Июль	0,120 ± 0,022	0,130 ± 0,012	< 0,500	0,080 ± 0,010	< 0,100
Белые мышцы	Октябрь	0,193 ± 0,001	0,803 ± 0,063	< 0,001	0,600 ± 0,058	< 0,001
	Январь	0,110 ± 0,012	0,904 ± 0,014	< 0,001	0,210 ± 0,021	< 0,010
	Апрель	0,160 ± 0,017	0,311 ± 0,012	< 0,001	0,210 ± 0,013	< 0,050
	Июль	0,112 ± 0,033	0,184 ± 0,011	< 0,100	0,190 ± 0,040	< 0,200
Мозг	Октябрь	0,031 ± 0,004	0,056 ± 0,014	< 0,100	0,012 ± 0,005	< 0,020
	Январь	0,060 ± 0,011	0,124 ± 0,012	< 0,100	0,046 ± 0,012	< 0,500
	Апрель	0,020 ± 0,001	0,036 ± 0,001	< 0,001	0,061 ± 0,012	< 0,020
	Июль	0,011 ± 0,004	0,018 ± 0,004	< 0,200	0,008 ± 0,001	< 0,500

низ карпа из окружающей среды исключалось. Известно также, что содержание глюкозы в мозге рыб поддерживается благодаря реакциям глюконеогенеза, уровень активности которого высокий в печени, несколько ниже в мозге и мышцах, что, в свою очередь, приводит к увеличению концентрации глюкозы и гликогена в печени, а также ее поступлению к мозгу и мышцам для обеспечения энергетического гомеостаза и поддержания пула интермедиаторов углеводного и энергетического обмена [15]. Снижение содержания глюкозы в тканях можно объяснить метаболическими преобразованиями, что проявляется в повышении активности соответствующих ферментов [2]. В течение года наибольшая активность Г-6-Фазы отмечена в печени (табл. 2), что подтверждается и данными литературы [9, 10, 22].

Зимой активность Г-6-Фазы во всех исследуемых тканях достоверно возрастает, а весной — уменьшается, достигая минимального значения в мозге и печени летом, а в белых мышцах — осенью [4]. Активность Ф-1,6-ДФазы в

печени и мозге была выше зимой, чем другие сезоны, а в белых мышцах — осенью (табл. 3).

В условиях пестицидного токсикоза активность исследуемых ферментов изменялась прежде всего в зависимости от токсиканта (см. табл. 2, 3). Так, 2,4-ДА вызывала увеличение активности Г-6-Фазы и Ф-1,6-ДФазы в течении года во всех тканях. Максимальные изменения Г-6-фазной активности в мышцах и мозге (соответственно в 3,12 и 6,45 раза) отмечены в апреле при повышении температуры окружающей среды и, соответственно, ускорении обменных процессов. В печени активность этого фермента под влиянием пестицидов в наибольшей степени изменилась в октябре (в 4,17 раза).

Изменения активности Ф-1,6-ДФазы при воздействии 2,4-ДА в печени и мышцах максимально проявлялись в январе (в 5,46 и 8,22 раза), а в мозге — в апреле, как и в Г-6-фазы (в 6,45 раза).

Действие зенкора на интенсивность протекания ферментных реакций в течение года неоднозначно. Так, он тормозил активность Г-6-Фазы во всех тканях весь год, за исключением весны, когда активность фермента возрастала в 2,39 раза в печени, 1,94 раза в мозге и 1,89 раза в белых мышцах. В мышцах ее активность возрастала также и осенью. Изменение активности Ф-1,6-ДФазы в печени и мозге аналогичны (активация в апреле и торможение в другое время). В белых мышцах зенкор вызвал увеличение ее активности независимо от времени года, максимальное — в октябре, когда различия составляли 2,11 раза.

Заключение

Исследования сезонных изменений содержания глюкозы в мозге, печени и белых мышцах карпа показали, что оно было максимальным в феврале, а минимальным — в апреле.

Была отмечена общая тенденция уменьшения содержания глюкозы во всех исследованных тканях при воздействии 2,4-ДА и зенкора, что согласуется с данными литературы [13]. В зависимости от токсиканта, времени года и исследуемого органа уменьшение количества углевода на грамм ткани колебалось от 1,33 раза до 2,91 раза. Гербицид 2,4-ДА вызывал большие изменения содержания глюкозы в исследованных органах по сравнению с зенкором. Эти изменения также определялись тканью и временем года. Из всех органов наименьшие изменения характерны для мозга рыб: достоверные различия отмечены только в январе ($18,3 \pm 1,70$ против $33,14 \pm 6,16$ мкмоль/г ткани, $P < 0,05$). Снижение содержания глюкозы в тканях можно объяснить метаболическими преобразованиями и участием в ряде метаболических процессов, что проявляется в повышении активности соответствующих ферментов [2]. Установлено, что при снижении температуры воды до 5—6°C токсичность зенкора возрастала, что вызывало значительное снижение содержания глюкозы во всех тканях.

В условиях низких температур для пойкилотермных животных увеличивается важность глюкозы как метаболита, поскольку она предотвращает замерзание тканевой жидкости, принимает участие в осморегуляции и синтезе промежуточ-

ных продуктов обмена. Ее количество возрастает за счет реакций глюконеогенеза, о чем может свидетельствовать активация ферментов этого процесса и снижение уровня свободных гликогенных аминокислот, в частности глицина, аланина и серина, которые, по данным исследователей [20, 23, 14] для других видов рыб служат исходными субстратами в реакциях глюконеогенеза.

Гербицид 2,4-ДА вызывал увеличение активности Г-6-Фазы и Ф-1,6-ДФазы, в то время как действие зенкора проявилось неоднозначно. Так, зенкор вызывал появление активности Г-6-Фазы в мышцах (в контрольной группе его активности в белых мышцах не обнаружено, что подтверждается данными литературы [7]) и активизацию Ф-1,6-ДФазы в 3,11 раза по сравнению с контролем. В отличие от белых мышц, в печени и мозге под влиянием зенкора активность обоих исследованных ферментов снижалась.

**

*Вивчено зміни активності ферментів кінцевих реакцій глюконеогенезу і вмісту глюкози у печінці, м'язах і мозку дворічок коропа лускатого (*Cyprinus carpio* L.) за дії зенкору та 2,4-ДА.*

**

*Changes in activity of the terminal gluconeogenesis enzymes and glucose content in liver, muscle and brain of the two-year-old carp (*Cyprinus carpio* L.) under the impact of pesticides zenkor and 2,4-DA were studied.*

**

1. Арсан О.М. Особенности функционирования основных механизмов энергообеспечения процессов акклимации рыб к абиотическим факторам водной среды: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — М., 1987. — 37 с.
2. Грубінко В.В. Системна оцінка метаболічних адаптацій у гідробіонтів // Наук. зап. Терноп. пед. ун-ту Сер. Біологія. — 2001. — № 4. — С. 36—39.
3. Смельяненко С.М., Каганер Л.І., Комарова О.А. Хімія і біологічна хімія. Практикум. — К.: Вища школа, 1988. — 219 с.
4. Коваль В.А., Яковенко Б.В. Фруктозо-1,6-дифосфатазная активность в организме карпа при зимнем голодании и под влиянием некоторых токсиантов // Гидробиол. журн. — 2000. — Т. 36, № 2. — С. 95—99.
5. Котов А.М. Особенности метаболизма углеводов в крови некоторых рыб Черного моря в разные сезоны года // Вопр. ихтиологии. — 1977. — Т. 17, № 2. — С. 369—371.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк. — 1990. — 352 с.
7. Ленинджер А.Л. Основы биохимии. — М.: Мир, 1985. — 368 с.
8. Ляугесте К., Кирсипуу А., Кангур А. Влияние питания и температуры воды на некоторые гистохимические показатели печени, белки сыворотки крови и биохимический состав мышц у леща // Биология пресноводных организмов Эстонии. — Тарту: Изд-во Тартус. ун-та, 1974. — С. 199—207.

9. Огородникова Л.Г. Глюкозо-6-фосфатазная активность тканей и ее роль у представителей различных классов позвоночных // Журн. эволюц. биохим. физиол. — 1981. — Т. 17, № 2. — С. 199—204.
10. Огородникова Л.Г., Лебединская И.И. Содержание гликогена, активность фосфоорилазы и глюкозо-6-фосфатазы в быстрых и медленных мышцах карпа *Cyprinus carpio* L. // Там же. — 1984. — Т. 20, № 1. — С. 17—20.
11. *Современные методы в биохимии* / Под ред. В. Н. Ореховича — М.: Медицина, 1964. — 345 с.
12. *Справочник по пестицидам: гигиена применения и токсикология*. Под ред. А.В. Павлова. — Киев: Урожай, 1986. — 432 с.
13. Явоненко О.Ф., Грубинко В.В., Жигенко А.О. Динаміка вуглеводів у тканинах молоді коропа в процесі зимівлі // Рибне господарство — 1993. — № 47. — С. 18—21.
14. Яковенко Б.В. Метаболізм гліцину в організмі коропа лускатого: Автореф. дис. ... докт. біол. наук. — Львів., 1993. — 37 с.
15. Bolognani F.A.M., Pederzoli A., Trevisan P. Parametri ematici e sierici in esemplari di *Carassius carassius* (L.) var *auratus* sottoposti ad inquinamento sperimento le acuto da Pb // Boll. Zool. — 1988. — N 55, Suppl. — P. 45—49.
16. 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.
17. Fiske C.L., Subarrow V. The colorimetric determination of phosphorus // Ibid. — 1925. — Vol. 66, N 1. — P. 375—400.
18. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
19. Mormede S., Davies I. M. Polychlorobiphenyl and pesticide residues in monkfish *Lophius piscatorius* and black scabbard *Aphanopus carbo* from the Rockall Trough // ICES J. Mar. Sci. — 2001. — Vol. 58, N 3. — P. 725—736.
20. Rowsell E.V., Carnie J.A., Wahbi S.D. et al. L-serine dehydratase and L-serine pyruvate transaminase activities in different animal species // Comp. Biochem. Physiol. — 1979. — N 63B. — P. 543—555.
21. Schachman H.K. Ultracentrifugation in Biochemistry. — New York: Acad. Press., 1959. — 356 p.
22. Shimeno S., Ikeda S. Studies on glucose-6-phosphatase of aquatic animals. 2. The enzyme activities in fish tissues // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. — 1967. — N 33. — P. 112—114.
23. Walton M.J., Cowey C.V. Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish // Comp. Biochem. Physiol. — 1982. — Vol. 73, N 1. — P. 59—79.