

ВПЛИВ ГЕРБІЦИДНОГО НАВАНТАЖЕННЯ НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ КАТАБОЛІЗМУ КОРОТКОЧАСНОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН КОРОПА (*CYPRINUS CARPIO L.*)

О.Б. Мехед, С.М. Деркач, О.П. Третяк

Чернігівський національний педагогічний університет імені Т. Г. Шевченка
вул. Гетьмана Полуботка, 53, Чернігів 14037, Україна, mehedOlga@mail.ru

Резюме. Досліджено активність ферментів білих м'язів, печінки та мозку коропа: гліколізу, циклу Кребса і пентозофосфатного шляху у відповідь на токсичну дію гербіцидів у короткочасній культурі клітин. Мета дослідження: з'ясувати вплив гербіцидів різної хімічної будови на активність ферментів катаболізму короткочасної культури клітин коропа (*Cyprinus carpio L.*). Застосовували спектрофотометричні методи дослідження. З'ясовано, що ферменти змінюють свою активність у відповідь на гербіцидний токсикоз, що формує адаптивну відповідь організму риб.

Ключові слова: короп, культура клітин, зенкор, раундап, 2,4-Д – малатдегідрогеназа, ізоцитратдегідрогеназа, лактатдегідрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа.

Вступ. В наш час в усьому світі, а, особливо, в Україні дуже різко постала проблема забруднення навколишнього середовища органічними речовинами, які за звичайних умов не розпадаються, або розпадаються дуже повільно. Особливо, це стосується гербіцидів, що мають властивість накопичуватись в живих організмах, що обумовлює важливість виявлення їхнього впливу на біохімічні процеси в живих організмах на різних рівнях організації живої матерії. Внаслідок антропогенного впливу на водойми, риби, як одна з найбільш високоорганізованих груп гідробіонтів, змушені використовувати різноманітні механізми пристосування до змінених умов навколишнього середовища. Попередніми дослідженнями встановлено, що вплив гербіцидів на метаболізм організму риб різноманітний і залежить від багатьох чинників: параметрів середовища, віку риб, пори року, особливостей живлення тощо (Лук'яненко, 1987; Мехед, 2005; Жиденко, 2009). Порівняння змін активності ферментів за дії токсикантів на рівні організму, культури клітин печінки та ферментного препарату печінки, зроблене нами раніше (Деркач та ін., 2011; Яковенко та ін., 2011), дозволило краще зрозуміти механізм адаптації. Актуальність даної роботи полягає в тому, що раніше не було досліджено вплив гербіцидів на біохімічні процеси, що протікають в культурі клітин. *Мета дослідження:* з'ясувати вплив гербіцидів різної хімічної будови на активність ферментів катаболізму короткочасної культури клітин коропа (*Cyprinus carpio L.*).

Матеріал і методи дослідження. Об'єктом дослідження слугувала культура клітин дворічного коропа (*Cyprinus carpio L.*). Період адаптації риб до лабораторних умов утримання складав 3 доби. Температурний режим води відповідав природному, коливався в межах 8–15°C. Корот-

кочасну культуру клітин печінки, білих м'язів та мозку одержували обробкою трипсином та ЕДТА з додаванням глюкози. Токсиканти вносились у вигляді розчинів у кількості, що відповідала 2 гранично допустимим концентраціям (2,4-Д - 0,2 мг/л; зенкор - 0,2 мг/дм³; раундап - 0,004 мг/дм³), експозиція 3 години. Досліджували лактатдегідрогеназу (ЛДГ) (Biochemica information, 1975) та глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу (Г-6-ФДГ) активність у цитоплазматичній фракції, а ізоцитратдегідрогеназу (ІЦДГ) та малатдегідрогеназу (МДГ) активність (Biochemica information, 1975) – у мітохондріальній фракції. Вміст білку в ферментативних препаратах визначали за методом Лоурі і співавторів (Lowry et al., 1951). Статистична обробка результатів проводилася загальноприйнятими методами за стандартними комп'ютерними програмами, а вірогідне розходження між середніми арифметичними величинами визначали за допомогою t-критерію Стьюдента. Відмінності між порівнюваними групами вважали вірогідними при * - P < 0,05.

Результати та їх обговорення. Порівнюючи активність ферментів у культурах клітин різних органів, можна зробити висновок про значно нижчі показники активності обох досліджуваних ферментів циклу Кребса (рис. 1, 2) у печінці (0,020±0,003 мкмоль NADP/мг білку за хв. для ІЦДГ та 0,040±0,007 мкмоль NAD/мг білку за хв. для МДГ) порівняно з даними показниками в культурі клітин білих м'язів (0,038±0,001 мкмоль NADP/мг білку за хв. та 0,076±0,014 мкмоль NAD/мг білку за хв. для обох ферментів відповідно). В той же час активність ензимів у культурі клітин, одержаних із мозку, майже не відрізняється від такої у біологічному препараті, виготовленому безпосередньо з нервової тканини коропа (Яковенко та ін., 2011) і становить

0,017±0,001 мкмоль NADP/мг білку за хв. для ІЦДГ та 0,018±0,002 мкмоль NAD/мг білку за хв. для МДГ.

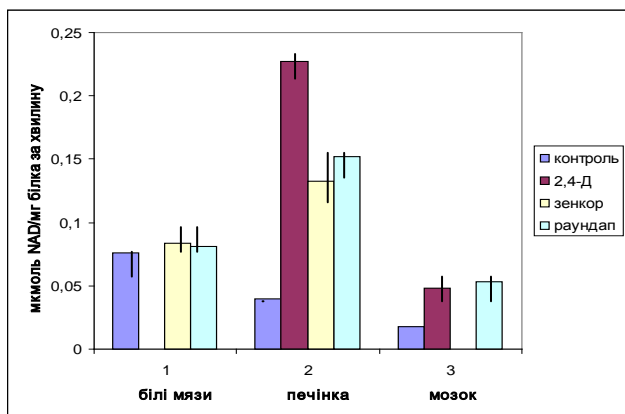


Рис. 1. Активність МДГ в короточасній культурі клітин різних органів коропа за дії гербіцидного токсикозу, мкмоль NAD / мг білку за хвилину ($M \pm m, n=5$)

Fig. 1. MDH activity in short-term culture of cells of different organs of carp from herbicide toxicity, $\mu\text{mol NAD} / \text{mg protein per minute}$ ($M \pm m, n=5$)

Вивчаючи вплив гербіцидного токсикозу на активність ізоцитратдегідрогенази культури клітин коропа (рис. 2), спостерігали залежність ензиматичної відповіді від хімічної структури гербіциду. Так, за дії 2,4-Д активність ферменту м'язів та печінки взагалі не відмічено. У культурі клітин, одержаній з мозку риб, гербіцид викликає активацію ензиму на 41%. Вплив зенкору проявляється у збільшенні активності ІЦДГ у клітинах усіх тканин, однак у різному ступені: у 11,4; 3,8 та 2,6 разів з печінки, білих м'язів та мозку відповідно. Раундап після трьохгодинної експозиції також викликає активацію ІЦДГ, однак найбільших змін зазнала активність ферменту культури клітин мозку (0,079±0,004 мкмоль NADP/мг білку за хв. проти 0,017±0,001 мкмоль NADP/мг білку за хв. у фізіологічних умовах).

Зміни активності малатдегідрогенази (рис. 1) значною мірою визначаються органом, з якого одержано культуру клітин. Так, у культурі клітин білих м'язів коропа активність МДГ майже не змінюється, порівняно з контролем (0,084±0,012 мкмоль NAD/мг білку за хв. та 0,081±0,023 мкмоль NAD/мг білку за хв. за дії зенкору та раундапу і 0,076±0,014 мкмоль NAD/мг білку за хв. за фізіологічних умов). Виключення становить 2,4-Д – даний гербіцид повністю пригнічує активність ензиму не лише в клітинах м'язів, а й мозку. В короточасній культурі клітин печінки гербіциди викликають активацію ензимів. Найбільший вплив за присутності 2,4-Д (0,227±0,045 мкмоль NAD/мг білку за хв. проти 0,040±0,007 мкмоль NAD/мг білку за хв.). Зенкор та раундап також сприяли активації роботи ферменту в значному ступені (0,133±0,005 мкмоль NAD/мг біл-

ку за хв. та 0,152±0,004 мкмоль NAD/мг білку за хв. відповідно).

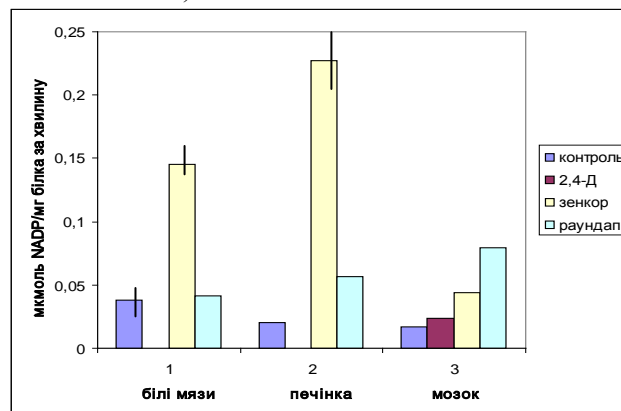


Рис. 2. Активність ІЦДГ в короточасній культурі клітин різних органів коропа за дії гербіцидного токсикозу, мкмоль NADP / мг білку за хвилину ($M \pm m, n=5$)

Fig. 2. Activity ITSDH in short-term culture of cells of different organs of carp from herbicide toxicity, $\mu\text{mol NADP} / \text{mg protein per minute}$ ($M \pm m, n=5$)

Дослідження токсичного впливу гербіцидів на активність ферментів у організмі коропа (Яковенко та ін., 2011) свідчать про найменшу лабільність лактатдегідрогенази серед досліджуваних ферментів. Це зумовило нашу зацікавленість у перевірці активності даного ензиму за дії гербіцидного токсикозу у короточасній культурі клітин, одержаній з різних органів коропа. В ході експерименту нами було встановлено зміни активності ІДГ за дії гербіцидного токсикозу. Як видно з діаграми (рис. 3), 2,4-Д, незалежно від органу, з якого отримано культуру клітин, викликає активацію ферменту, на відміну від інших гербіцидів. Так, вплив зенкору неоднозначний: у культурі клітин білих м'язів і печінки він гальмує діяльність ферменту, а у мозку, навпаки, викликає активацію ІДГ у 1,8 разів. Раундап пригнічує активність ферменту: у культурі клітин білих м'язів взагалі не виявлено роботи ІДГ, у печінці зменшення активності сягає майже 4 разів. Виключення становить мозок: у культурі клітин, одержаній з даного органу, відмічається активація ферменту у 3 рази, порівняно з контролем. Як правило, ІДГ незначно реагує на вплив пестицидів (Мехед, 2005; Яковенко та ін., 2011).

На відміну від ІДГ, зміни активності МДГ мають чітко виражені тканинні особливості (рис. 1). Так, у культурі клітин білих м'язів, активність ферменту не виявлено за дії 2,4-Д, а інші токсиканти майже не змінюють досліджуваній показник. У короточасній культурі клітин з печінки і мозку прослідковується значна активація МДГ за дії гербіцидів. Виняток становить активність ферменту у мозку за дії зенкора.

Характеризуючи роботу ІЦДГ, потрібно відмітити, що внесення 2,4-Д в короточасну культуру клітин незначно активує фермент мозку і повністю пригнічує його активність у клітинах

інших тканин. Зенкор і раундап призводять до активації НАДФ - залежної ПДГ, але у різному ступені (рис. 2).

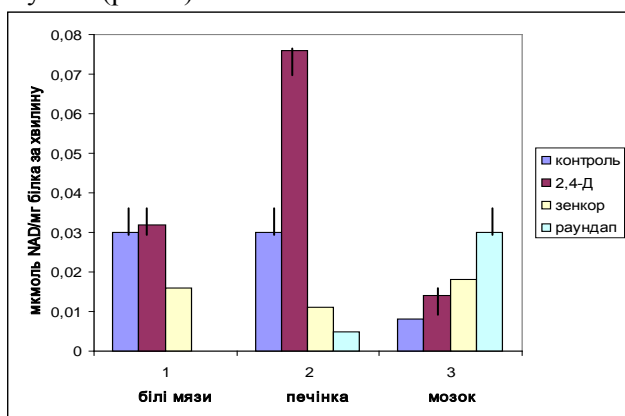


Рис. 3. Активність ЛДГ в короткочасній культурі клітин різних органів коропа за дії гербіцидного токсикозу, мкмоль НАД / мг білка за хвилину ($M \pm m, n=5$)

Fig. 3. LDH activity in short-term culture of cells of different organs of carp from herbicide toxicity, $\mu\text{mol NAD} / \text{mg protein per minute}$ ($M \pm m, n=5$)

Активність Г-6-ФДГ виявилась чутливою до раундапу (рис. 4).

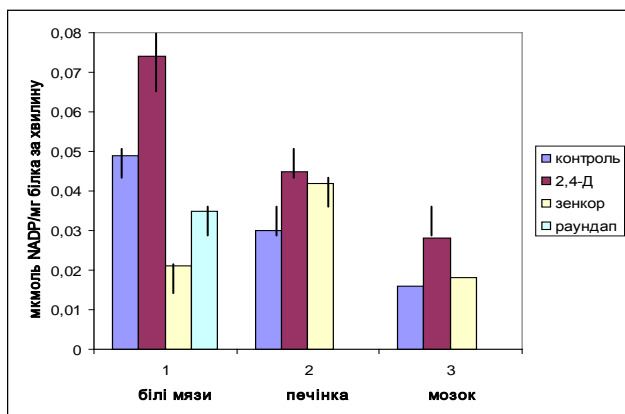


Рис. 4. Активність Г-6-ФДГ в короткочасній культурі клітин органів коропа за дії гербіцидного токсикозу, мкмоль НАДФ / мг білка за хвилину ($M \pm m, n=5$)

Fig. 4. Active glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in short-term cell culture of carp for the actions of herbicide toxicity, $\mu\text{mol NADP} / \text{mg protein per minute}$ ($M \pm m, n=5$)

Це підтверджується повним пригніченням активності ферменту після трьохгодинної експозиції культури клітин печінки і мозку. 2,4-Д викликає активацію ферменту незалежно від органу, з якого отримано короткочасну культуру клітин.

INFLUENCE OF HERBICIDE LOAD ON THE ENZYME ACTIVITY CATABOLISM OF SHORT-TERM CELL CULTURE CARP (*CYPRINUS CARPIO* L.)

O.B. Mekhed, S.M. Derkach, O.P. Tretiak

The enzyme activity of white muscle, liver and brain carp: glycolysis, Krebs cycle and pentozofosfatnoho way in response to the toxic effects of herbicides in short-term cell culture have been investigated. The aim of our research is to determine the influence of herbicides with different chemical structure of the enzyme activity catabolism of short-term cell culture carp (*Cyprinus carpio* L.). We have used spectrophotometric methods. It was found that enzymes change their activity in response to herbicide toxicosis, which forms the adaptive response of fish.

Keywords: carp, culture, cells, zenkor, roundup, 2,4-D – malate dehydrogenase, izotsytratdehidrohenaza, lactate, glucose-6-phosphate dehydrogenase.

Вплив зенкору має виражений тканинний характер. Відомо, що однією з функцій пентозо – фосфатного шляху є утворення відновлених форм НАДФН+ за участю Г-6-ФДГ. Відновлені НАДФН+ використовуються у біосинтезі жирів. Останні необхідні організму риб не лише як джерело енергії, а також для біосинтезу глюкози, зокрема в період зимового голодування, коли даний моносахарид відсутній у навколишньому середовищі в період зимівлі.

Висновки. Ізольовані клітини коропа для підтримання сталості власних внутрішніх умов, незалежно від змін у навколишньому середовищі, здатні змінювати активність ферментів, що, ймовірно, дозволяє тканині зберігати цілісність і запобігає проліферації клітин, відокремлених від нормального оточення. Досліджені гербіциди викликають специфічні зміни обміну речовин в тканинах коропа. Досліджувані ферменти змінюють свою активність у відповідь на гербіцидний токсикоз, що формує адаптивну відповідь організму риб.

Список літератури:

1. Деркач С.М., Мехед О.Б., Третяк О.П. Ензиматичні властивості культури клітин коропа за дії гербіцидного токсикозу // Сучасні екологічні проблеми Українського Полісся і суміжних територій (до 25-річчя аварії на ЧАЕС): Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції (26-28 квітня 2011 р.). – Ніжин: ПП Лисенко М.М., 2011. – С. 133–135.
2. Жиденко А.О. Морфологічні адаптації різновікових груп *Cyprinus carpio* L. за несприятливої дії екологічних факторів: Автореферат дис. ... д-ра біол. наук. – Одеса, 2009. – 40 с.
3. Лукьяненко В.И. Экологические аспекты ихтиотоксикологии. – М.: ВО «Агропромиздат», 1987. – 240 с.
4. Мехед О.Б. Вплив пестицидного забруднення водного середовища на іхтіологічні показники та метаболічні перетворення в організмі коропа. Автореф. дис. ... канд. біол. наук: спец. 03.00.10 – «Іхтіологія». – Київ, 2005. – 20 с.
5. Яковенко Б.В., Третяк О.П., Мехед О.Б., Деркач С.М., Чкана Н.В. Активність деяких ферментів у печінці коропа за дії гербіцидів // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. – 2011. – №2 (47). – С. 233–236.
6. Biochemica information. – W. Germany: Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, 1975. – Bd. 1, 2. – 167 p.
7. Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.I., Randal R.I. Determination of enzymes in the liver of the fish // J. Biol. Chem., 1951. – 193, № 1. – P. 265–275.

Отримано редколегією 10.07.2012