

Таблица 5. Классификация пестицидов по степени тератогенной опасности

Коэффициент пороговых концентраций, $K_{п}^{эмб}$	Класс опасности
> 10	I – чрезвычайно опасные
5–10	II – высокоопасные
1–5	III – опасные
< 1	IV – умеренно опасные

В таблице 6 представлены результаты оценки тератогенной опасности карбоксамидов. Согласно проведенным исследованиям карбоксамиды являются умеренно опасными пестицидами по степени их тератогенности для осетровых и бычковых рыб.

Таблица 6. Параметры токсичности и тератогенности карбоксамидов для эмбрионов рыб

Фунгицид	Тест-объект	ЛК ₁₆ , мг/л	Э _{тер} К ₁₆ , мг/л	Коэффициент пороговых концентраций, $K_{п}^{эмб}$ (класс опасности)
Пенфлуфен	бычок-кругляк	0.53	–	–
	стерлядь	0.39	0.22	1.77 (III)
Биксафен	бычок-кругляк	0.48	0.87	0.55 (IV)
	бестер	0.52	0.77	0.68 (IV)
Этабосам	бычок-кругляк	0.31	2.00	0.16 (IV)
	осетр	0.21	0.40	0.53 (IV)
Боскалид	бычок-кругляк	0.14	1.09	0.13 (IV)
	бестер	0.25	0.51	0.49 (IV)

Таким образом, проведенные исследования показали, что карбоксамидные фунгициды нового поколения даже в низких концентрациях оказывали существенное токсическое действие на бычковых и осетровых рыб в период раннего онтогенеза. Карбоксамиды вызывали нарушения развития и выклева эмбрионов, замедляли рост мальков бычка-кругляка и предличинки осетровых рыб, проявляли выраженное тератогенное действие, способствуя развитию необратимых патоморфологических изменений. Результаты исследований свидетельствуют о потенциальной опасности этих фунгицидов для воспроизводства бычковых и осетровых рыб в случае попадания их в рыбохозяйственные водоемы.

Список литературы:

- Левина И.Л., Щербакова Н.И., Полуян А.Я. Способ оценки токсического действия пестицидов на водные объекты, Патент на изобретение № 2446396
- Прозоровский В.Б. Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности// Фармакол. И токсикол. 1962. Т.25, № 1. С. 115-120

УДК 577.1.57.044:152.574.2:597.54

ВЛИЯНИЕ КСЕНОБИОТИКОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОХРОМОВ P-450 И b5 И АКТИВНОСТЬ НАДФ-ГЕНЕРИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ В ТКАНЯХ КАРПА

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

Черниговский национальный педагогический университет имени Т. Г. Шевченко
Ул. Г.Полуботка, 53, г. Чернигов, Украина, 14033, Mekhedolga@mail.ru

Изучалось влияние пестицида (Зенкор), поверхностно - активного вещества (натрий лаурилсульфат) на содержание цитохромов P-450 и b5, активность НАДФН - генерирующих ферментов (глюкозо -6- фосфатдегидрогеназы и 6 – фосфоглюконатдегидрогеназы) печени и белых мышц карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio* L.).

Ключевые слова: Зенкор, натрий лаурилсульфат, цитохромы P-450 и b5, глюкозо -6- фосфатдегидрогеназа, 6 – фосфоглюконатдегидрогеназа.

На сегодняшний день в результате антропогенной деятельности образуется большое количество токсичных для организма веществ (промышленные отходы, пестициды, препараты

бытовой химии, лекарственные средства и др.). Гидрофильные ксенобиотики выводятся из организма в неизмененном виде с мочой, гидрофобные могут задерживаться в тканях, связываясь с белками или образуя комплексы с липидами клеточных мембран. Со временем накопление в клетках тканей инородного вещества приводит к нарушению их функций. Для удаления таких соединений в процессе эволюции выработались механизмы их детоксикации и выведения из организма. Система обезвреживания включает множество разнообразных ферментов, под действием которых практически любой ксенобиотик может быть модифицирован. Среди них особую роль играет система гемопротеидов Р-450 и b5, а также НАД + и НАДФ + - редуктазы, локализованные в микросомах клеток [1-3]. Реакции, которые осуществляет эта система, направлены на защиту живых организмов от накопления в них гидрофобных соединений. Цитохромы Р-450 и b5, а также НАДН - и НАДФН - редуктазы образуют монооксигеназную систему. В отличие от других гемопротеидов, обладающих, как правило, в клетке только одним видом активности и строго определенной функцией, Р-450 является уникальным, ведь субстраты его действия и реакции, которые он катализирует, разнообразны. Из многочисленных компонентов этой системы только цитохром Р-450 способен активировать молекулярный кислород с участием электронов, донором которых являются НАДФН и цитохром b5.

Цель исследования: изучение влияния пестицида (Зенкор), поверхностно - активного вещества (натрий лаурилсульфат) на содержание цитохромов Р-450 и b5, активность НАДФН - генерирующих ферментов (глюкозо -6- фосфатдегидрогеназы - КФ 1.1.1.49 и 6 - фосфоглюконатдегидрогеназы - КФ 1.1.1.44) печени и белых мышц карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio L.*).

Исследования проводились в ноябре-декабре 2013 года на двухлетках карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio L.*) массой 180-250 г. По данным ихтиопатологических наблюдений на рыбах возбудителей паразитических болезней не выявлено. Опыты по изучению влияния токсикантов проводили в модельных условиях - аквариумах объемом 200 дм³ с отстоянной водопроводной водой, в которых рыбу размещали из расчета 1 экземпляр на 40 дм³ воды. Период адаптации составлял 3 суток, влияния токсикантов - 14 суток. Рыб не кормили. Во всех случаях осуществляли контроль и поддерживали постоянный гидрохимический режим воды. Рыбу содержали в трех вариантах: контроль, действие Зенкора и действие натрия лаурилсульфата. Концентрацию ксенобиотиков, которая соответствовала двум предельно допустимым концентрациям создавали путем внесения 40%-ного порошка натрия лаурилсульфата, концентрация Зенкора составляла 0.2 мг/дм³ и достигалась внесением 70%-го порошка Зенкора. Вся работа проводилась в соответствии с конвенцией Совета Европы о защите позвоночных животных, которых используют в научных целях.

Для исследования использовали печень и белые мышцы, гомогенизировали в 0.05 М трис - НСl буфере (рН 7.5), содержащем 0.025 М сахарозы, 0.005 М MgCl₂, 0.025 М KCl, 0.008 М CaCl₂. После 60 мин экстракции при 4°С гомогенаты центрифугировали 20 мин при 6000 об / мин. Состояние монооксигеназной системы оценивали по содержанию цитохромов Р-450 и b5. Определение содержания цитохрома b5 основано на измерении разницы в поглощении окисленной и восстановленной форм гемопротеидов, а цитохрома Р-450 - на измерении величины поглощения комплекса восстановленного цитохрома Р-450 с окисью углерода при 450 нм. Измерение содержания цитохромов b5 [4] и Р450 [5] проводили в суспензии микросом на спектрофотометре (по двухлучевой схеме). В каждую из кювет вносили по 3 мл инкубационной смеси.

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконат-дегидрогеназы определяли в надосадочной жидкости спектрофотометрически по восстановлению НАДФ при 340 нм [6]. Активность ферментов выражали в мкмольх НАДФ, восстанавливаемого ферментами, в расчете на 1 мг белка за минуту. Содержание белка в микросомальной фракции тканей определяли по методу Лоури [7].

Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием программы "Excel" из пакета "Microsoft Office-2003" и программ Statistika 6.0.

В результате проведенных исследований было установлено, что содержание цитохрома b5 в печени карпа чешуйчатого под влиянием Зенкора снизилось на 28.13%, а в результате действия натрия лаурилсульфата - на 21.19%. В белых мышцах снижение содержания цитохрома b5 незначительное и, по сравнению с данными контрольной группы рыб, составляет в условиях интоксикации Зенкором 12.5%, а в условиях интоксикации натрия лаурилсульфатом - 18.75%. Что касается содержания цитохрома Р-450, то под влиянием Зенкора его содержание снизилось в 1.4 раза. Влияние натрия лаурилсульфата обусловило уменьшение содержания данного цитохрома в 1.3 раза. Содержание цитохрома Р-450 в белых мышцах карпа чешуйчатого под действием Зенкора и натрия лаурилсульфата одинаково, изменения по сравнению с данными контрольной группы рыб составляют 27.3%.

Итак, установлено, что содержание цитохромов b5 и P-450 в печени и белых мышцах рыб в условиях интоксикации Зенкором и натрий лаурилсульфатом снизилось во всех тканях рыб экспериментальных групп. Указанные изменения цитохрома P-450, вероятно, обусловлены активацией процессов перекисного окисления липидов в микросомах, что приводит к деградации молекул цитохрома P-450. Снижение содержания цитохрома b5, возможно, связано с нарушениями в функционировании электронотранспортной цепи. Все эти факторы могли привести к развитию оксидативного стресса.

В результате исследования было выявлено, что активность НАДФН - генерирующих ферментов под действием Зенкора и натрий лаурилсульфата снизилась в тканях рыб экспериментальных групп по сравнению с контролем.

В частности, количественные показатели активности глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы в условиях интоксикации Зенкором снизились на 5.3 % в печени и на 19.3 % в белых мышцах от данных контрольной группы рыб. Аналогичные изменения наблюдались в условиях интоксикации лаурилсульфатом.

В печени карпа активность глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы уменьшилась на 19.3 %, а в белых мышцах - на 12.5 %. Активность 6-фосфоглюконат-дегидрогеназы в печени и белых мышцах рыб также снизилась по сравнению с показателями контрольной группы животных. Установлено, что активность 6-фосфоглюконат дегидрогеназы при действии Зенкора в печени уменьшилась на 8.8 %, в белых мышцах - на 9.7 %. В условиях интоксикации лаурилсульфатом активность фермента в белых мышцах уменьшается на 13.9 %, а в печени достоверные изменения активности фермента составляют 24.5 %.

Таким образом установлено, что натрий лаурилсульфат и Зенкор снижают активность НАДФН - генерирующих дегидрогеназ печени и белых мышц карпа. Возможно, это вызвано нарушением липидного обмена и разрушительным влиянием на монооксигеназные системы, повлекшее интоксикацию организма рыб.

Выводы.

1. Установлено снижение содержания цитохромов P -450 и b5 в тканях печени и белых мышцах карпа в условиях интоксикации Зенкором и натрий лаурилсульфатом. Возможно это вызвано гиперпродукцией свободных радикалов и активных форм кислорода, которые создают предпосылки для развития окислительного стресса.

2. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при использовании Зенкора в количестве 2 предельно допустимые концентрации уменьшается в печени на 5.3 %, а в белых мышцах на 19.3 %. В условиях интоксикации натрий лаурилсульфатом – на 19.3 % и 12.5 % соответственно.

3. Активность 6- фосфоглюконат-дегидрогеназы под действием таких же доз Зенкора уменьшается в печени на 8.8 %, а в белых мышцах - на 9.7 %. В условиях интоксикации натрий лаурилсульфатом - на 13.9 % и 24.5 %, соответственно.

Список литературы

1. Bondy S.C. Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species // *Biochem. Pharmacol.* — 1994. — Vol. 48. — P. 155-159.
2. Caro A.A. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1 // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 2004. — Vol. 44. — P. 27-42.
3. Chen X.-L. Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases // *Curr. Pharm. Des.* — 2004. — Vol. 10. — P. 879- 891.
5. Omura T., Sato R. The carbon monooxidate-binding pigment of liver microsomes // *J. Biol. Chem.* — 1964. — V. 239. — P. 2379– 2385.
6. Koop D.R. Inhibition of ethanol-inducible cytochrome P-450 2E1 by 3-amino-1,2,4-triazole // *Chem. Res. Toxicol.* — 1990. — №3. — P. 377–383.
7. Bottomley R. H., Pilot H. C., Potter V. R., Morris H. P. Metabolic adaptations in rat hepatomas. Reciprocal relationship between threonine dehy-drase and glucose-6- phosphate dehydrogenase // *Canc. Res.* — 1963. — Vol. 23, N 1. — P. 400–409.
8. Lowry O.H., Rosebrough H. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. - № 1. — P. 265-275.