

УДК: 574:591.5:504:597.6/9

Зміни вмісту цитохромів P-450 і b5 та активності НАДФ-генеруючих ферментів у тканинах коропа під впливом поверхнево-активних речовин
Б.В.Яковенко, О.Б.Мехед, О.В.Іскевич

*Чернігівський національний педагогічний університет імені Т.Г.Шевченка
mekhedolga@mail.ru*

Досліджено вплив синтетичного миючого засобу в осінній та зимовий періоди та натрій лаурилсульфату на вміст цитохромів P-450 і b5, активність НАДФН-генеруючих ферментів (глюкозо-6-фосфатдегідрогенази – КФ 1.1.1.49 і 6-фосфоглюконатдегідрогенази – КФ 1.1.1.44) печінки та білих м'язів коропа лускатого (*Cyprinus carpio* L.). Застосовані концентрації синтетичного миючого засобу спричинюють значне зменшення вмісту цитохромів P-450 та b5 в печінці та білих м'язах коропа лускатого у зимовий період. Активність НАДФН-генеруючих ферментів печінки за умов інтоксикації синтетичним миючим засобом значно знижується в осінній період, НАДФН-генеруючих ферментів монооксигеназної системи білих м'язів – в зимовий період. Вміст цитохромів P-450 і b5 у тканинах печінки та білих м'язів коропа лускатого за умов інтоксикації натрій лаурилсульфатом знижується в усіх піддослідних групах у порівнянні з контролем.

Ключові слова: *короп лускатий, монооксигеназна система, натрій лаурилсульфат, поверхнево-активні речовини.*

Изменение содержания цитохромов P-450 и b5 и активности НАДФ-генерирующих ферментов в тканях карпа под влиянием поверхностно-активных веществ
Б.В.Яковенко, О.Б.Мехед, Е.В.Іскевич

Исследовано влияние синтетического моющего средства в осенний и зимний периоды и натрий лаурилсульфата на содержание цитохромов P-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.). Примененные концентрации синтетического моющего средства вызывают значительное уменьшение содержания цитохромов P-450 и b5 в печени и белых мышцах карпа чешуйчатого в зимний период. Активность НАДФН-генерирующих ферментов печени в условиях интоксикации синтетическим моющим средством значительно снижается в осенний период, НАДФН-генерирующих ферментов монооксигеназной системы белых мышц – в зимний период. Содержание цитохрома P-450 и b5 в тканях печени и белых мышцах карпа чешуйчатого в условиях интоксикации натрий лаурилсульфатом снижается во всех опытных группах по сравнению с контролем.

Ключевые слова: *карп чешуйчатый, монооксигеназная система, натрий лаурилсульфат, поверхностно-активные вещества.*

Changes of P450 and b5 cytochromes concentration and of NADP-generating enzymes activity in carp tissues under the influence of surfactants
B.V.Yakovenko, O.B.Mekhed, O.V.Iskevych

The influence of sodium lauryl sulfate and synthetic cleaning agent in fall/winter periods on P-450 and b5 cytochromes concentration, NADPH-generating enzymes (glucose-6-phosphate dehydrogenase – KF 1.1.1.49 and 6-phosphogluconate dehydrogenase – KF 1.1.1.44) activity of liver and white muscles of *Cyprinus carpio* L. has been studied. Applied concentrations of synthetic cleaning agent caused a significant reduction of P-450 and b5 cytochromes in the liver and white muscle of carp in the winter period. The activity of NADPH-generating enzymes of liver at intoxication by synthetic cleaning agent significantly reduced in the autumn period, NADPH-generating enzymes of monooxygenase system of white muscles – in the winter. P-450 and b5 cytochromes content in liver tissues and muscles of *Cyprinus carpio* L. under intoxication by sodium lauryl sulfate reduced in all experimental groups compared to the control.

Key words: *carp scaly, monooxygenase system, sodium lauryl sulfate, surfactants.*

Вступ

Значну частину антропогенного навантаження, яке припадає на поверхневі водні об'єкти, складають стічні води, що містять синтетичні поверхнево-активні речовини, які входять до складу всіх господарсько-побутових і більшості промислових стічних вод. Поверхнево-активні речовини (ПАР) – різновид ксенобіотиків, який широко застосовують у господарській діяльності та побуті як мийні засоби, антикорозійні речовини, емульгатори і суспендизатори пестицидів та ін. (Вернигорова и др., 2005). Вищезазначене зумовлює актуальність вивчення особливостей протікання обміну речовин та його інтенсивності в тканинах гідробіонтів, зокрема риб, в умовах забруднення середовища даними ксенобіотиками. Потрапляючи у водойми, ПАР викликають багаточисельні негативні наслідки для гідробіонтів в результаті безпосередньої токсичної дії або в результаті глибокого порушення ланцюгів живлення (Гандзюра, 2004; Герман, 2002; Жаркова, Кобегенова, 2003). Синтетичний миючий засіб (СМЗ), який використовувався для дослідження, містить аніоноактивну поверхнево-активну речовину, що являє собою суміш алкілсульфатів, які містять від 55 до 85% натрій лаурилсульфату.

Одним із способів захисту організму від накопичення чужорідних речовин є наявність у клітинах мікосомальних монооксигеназних систем, що забезпечують, як правило, детоксикацію і виведення ксенобіотиків. Серед них особливу роль відіграє система гемопротеїдів P-450 і b5, а також НАД⁺ і НАДФ⁺-редуктази, які розташовані в мікосомах клітин. Реакції, які здійснює ця система, спрямовані на захист живих організмів від накопичення в них гідрофобних сполук. Цитохроми P-450 і b5, а також НАДН- і НАДФН-редуктази утворюють монооксигеназну систему. На відміну від інших гемопротеїдів, що мають у клітині, як правило, лише одну активність і строго визначену функцію, P-450 є унікальним, адже субстрати його дії та реакції, які він каталізує, різноманітні. З численних компонентів цієї системи тільки цитохром P-450 здатен активувати молекулярний кисень за участю електронів, донором яких є НАДФН і цитохром b5 (Галкін, Філіпова, 2010; Головенко, Карасева, 1983; Кржечковская, 2005; Кузнецова и др., 2007; Куценко, 2004).

Мета дослідження: вивчення впливу синтетичного мючого засобу в осінній та зимовий періоди та натрій лаурилсульфату на вміст цитохромів P-450 і b5, активність НАДФН-генеруючих ферментів (глюкозо-6-фосфатдегідрогенази – КФ 1.1.1.49 і 6-фосфоглюконатдегідрогенази – КФ 1.1.1.44) печінки та білих м'язів коропа лускатого (*Cyprinus carpio* L.).

Методика

Дослідження проводились в жовтні–грудні 2013–2014 років на дворічках коропа лускатого (*Cyprinus carpio* L.) масою 250–350 г. За даними іхтіопатологічних спостережень на рибах збудників паразитичних хвороб не виявлено. Досліди з вивчення впливу токсикантів проводили в модельних умовах – акваріумах об'ємом 200 дм³ з відстояною водопровідною водою, у якій рибу розміщували з розрахунку 1 екземпляр на 40 дм³ води. Період адаптації складав 3 доби, впливу токсикантів – 14 діб. Риб не годували. В усіх випадках здійснювали контроль і підтримували постійний гідрохімічний режим води. Рибу утримували у трьох варіантах: контроль, дія лаурилсульфатвмісного синтетичного мючого засобу (СМЗ) та дія чистого натрій лаурилсульфату (НЛС). Концентрацію ксенобіотиків, що відповідала двом гранично допустимим концентраціям, створювали шляхом внесення СМЗ з масовою частотою натрій лаурилсульфату 60% та чистого НЛС.

Для дослідження брали печінку та білі м'язи, гомогенізували в 0,05 М трис-НСІ буфері (рН 7,5), що містив 0,025 М сахарози, 0,005 М MgCl₂, 0,025 М KCl, 0,008 М CaCl₂. Після 60 хв екстракції при 4°C гомогенати центрифугували 20 хв при 4500 г. Стан монооксигеназної системи оцінювали за вмістом цитохрому P-450 та b5. Визначення вмісту цитохрому b5 засноване на вимірюванні різниці в поглинанні окисленої і відновленої форм гемопротеїдів, а цитохрому P-450 – на вимірюванні величини поглинання комплексу відновленого цитохрому P-450 з карбон (II) оксидом при 450 нм (Физиолого-биохимические ..., 2005). Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФД) і 6-фосфоглюконат-дегідрогенази (6-ФГД) визначали в надосадовій рідині спектрофотометрично за відновленням НАДФ при 340 нм (Biochemica information, 1975). Вміст білка у мікосомальній фракції печінки визначали за методом Лоурі (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 і обговорення

В результаті досліджень, проведених в осінній період, було встановлено, що вміст цитохрому b5 в печінці коропа лускатого під впливом СМЗ знизився на 21,19% (рис. 1). В білих м'язах зниження вмісту цитохрому b5 незначне і, в порівнянні з даними контрольної групи риб, становить 18,75%. Дослідження в зимовий період дали такі результати – в печінці та білих м'язах коропа лускатого внаслідок дії синтетичного миючого засобу вміст цитохрому b5 знизився на 45,5% (рис. 1). Що стосується вмісту цитохрому Р-450, то в осінній період під впливом СМЗ у печінці його вміст знизився у 1,3 рази, тобто на 21,1%, у білих м'язах – на 27,3%. У зимовий період вміст цитохрому Р-450 у печінці та білих м'язах коропа лускатого за дії досліджуваної поверхнево-активної речовини в порівнянні з даними контрольної групи риб зміни становлять 45,5% та 28,6% відповідно (рис. 2).

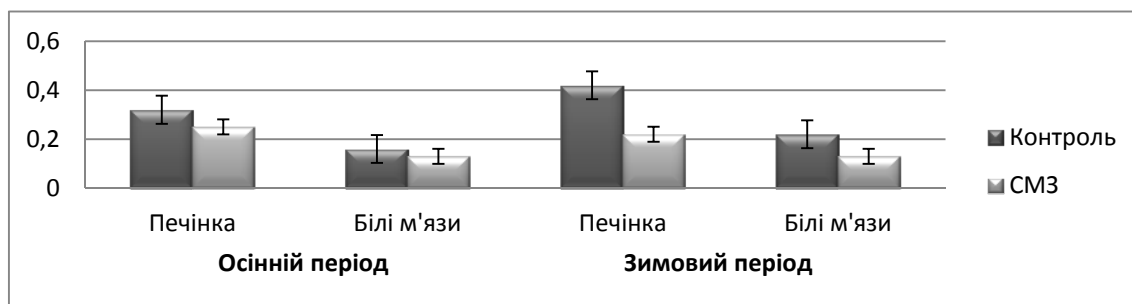


Рис. 1. Вміст цитохрому b5 в печінці та білих м'язах коропа лускатого за дії СМЗ в осінній та зимовий періоди ($M \pm m$, $n=5$, нмоль/мг білка)

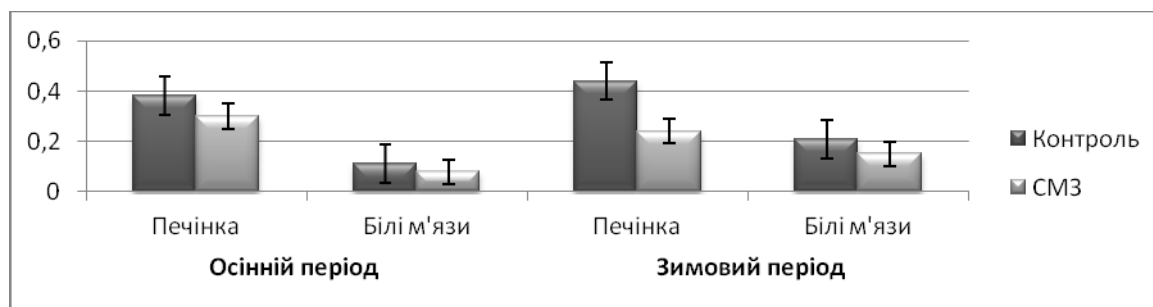


Рис. 2. Вміст цитохрому Р-450 в печінці та білих м'язах коропа лускатого за дії СМЗ в осінній та зимовий періоди ($M \pm m$, $n=5$, нмоль/мг білка)

Оскільки основним компонентом використовуваного СМЗ є натрій лаурилсульфат, то було проведено дослідження щодо визначення впливу чистого натрій лаурилсульфату на вміст цитохромів монооксигеназної системи печінки та білих м'язів коропа лускатого.

В ході дослідження було отримано такі результати – вміст цитохрому b5 в печінці коропа лускатого за умов інтоксикації натрій лаурилсульфатом знизився на 48,0%, в білих м'язах зниження вмісту цитохрому b5 в порівнянні з даними контрольної групи риб становить 40,9%. Що стосується вмісту цитохрому Р-450 у печінці, то під впливом натрій лаурилсульфату він знизився у 2 рази, тобто на 52,3%, у білих м'язах зміни становлять 42,9% (рис. 3).

В результаті дослідження було виявлено, що активність НАДФН-генеруючих ферментів під дією СМЗ та натрій лаурилсульфату знизилась у всіх дослідницьких групах в порівнянні з контролем.

Зокрема, кількісні показники активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у осінній період за умов інтоксикації СМЗ знизилися на 19,3% у печінці та на 12,5% у білих м'язах від даних контрольної групи риб. Аналогічні зміни спостерігалися за умов СМЗ в зимовий період, а саме – у печінці коропа лускатого активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази зменшилась на 11,1%, а у білих м'язах на 43,2% (рис. 4).

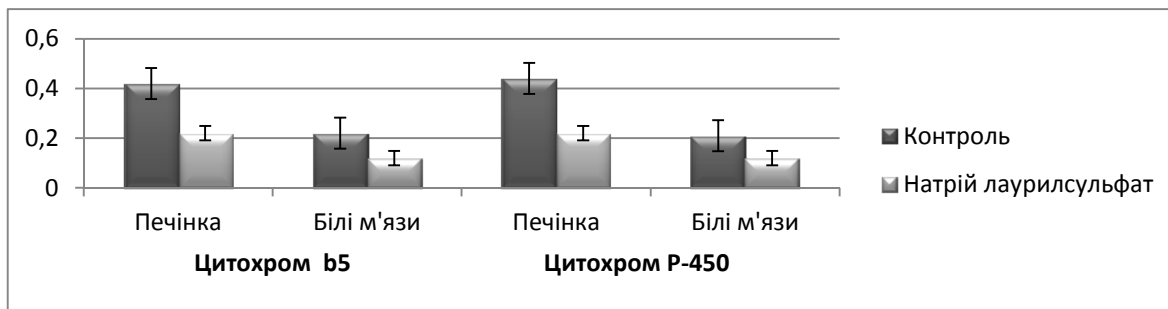


Рис. 3. Вміст цитохрому P-450 та b5 в печінці та білих м'язах коропа лускатого за дії натрій лаурилсульфату ($M \pm m$, $n=5$, нмоль/мг білка)

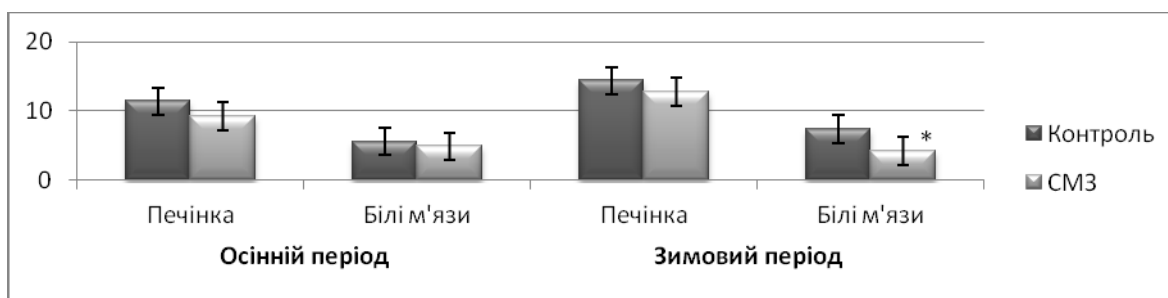


Рис. 4. Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в печінці та білих м'язах коропа лускатого за дії токсикантів в осінній та зимовий періоди ($M \pm m$, $n=5$, нмоль НАДФН/мг білка за хв)

Що стосується 6-фосфоглюконатдегідрогенази, то активність даного ферменту у печінці та білих м'язах коропа також зменшилася за дії токсикантів. Встановлено, що активність 6-фосфоглюконатдегідрогенази за дії SM3 в осінній період зменшилась на 24,5% у печінці, на 13,9% – у білих м'язах. Під час дослідження в зимовий період якісні зміни активності 6-фосфоглюконатдегідрогенази за умов інтоксикації SM3 становили 15,5% у печінці та 27,1% в білих м'язах (рис. 5).

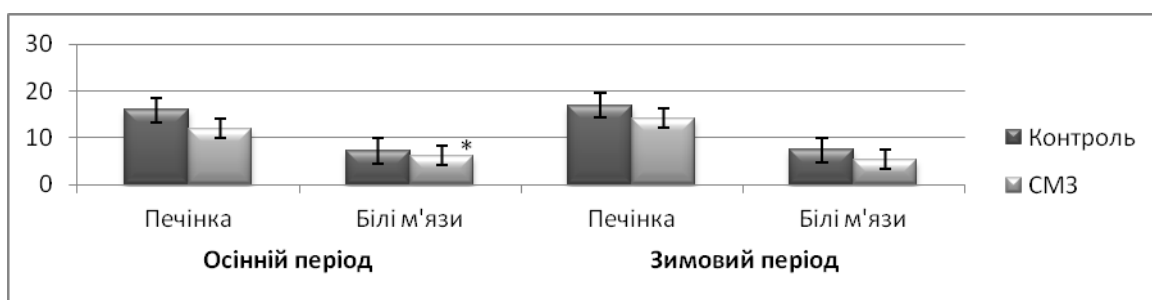


Рис. 5. Активність 6-ФГД в печінці та білих м'язах коропа лускатого за дії SM3 в осінній та зимовий періоди ($M \pm m$, $n=5$, нмоль НАДФН/мг білка за хв).

Зниження активності ферментів монооксигеназної системи печінки та білих м'язів коропа лускатого було виявлено і за умов інтоксикації натрій лаурилсульфатом (рис. 6).

Кількісні показники зміни активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у печінці становлять 29,2%, у білих м'язах 32,4% від даних контрольної групи риб. Активність 6-фосфоглюконатдегідрогенази у печінці та білих м'язах коропа лускатого зменшилась на 33,7% та 30,0% відповідно.

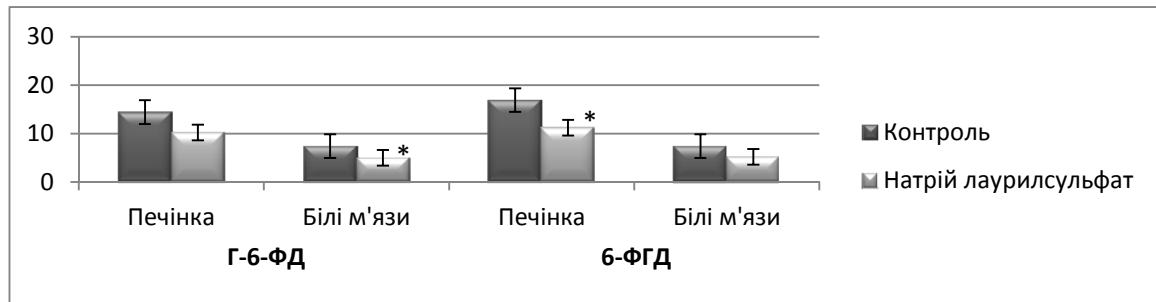


Рис. 6. Активність Г-6-ФД та 6-ФГД в печінці та білих м'язах коропа лускатого за дії натрій лаурилсульфату ($M \pm m$, $n=5$, нмоль НАДФН/мг білка за хв)

Таким чином, в ході експерименту було встановлено, що вміст цитохромів b5 та P-450 у печінці та білих м'язах риб за умов інтоксикації СМЗ та натрій лаурилсульфатом знизився у всіх дослідних групах. Крім того, виявлено, що організм коропа лускатого піддається більшому впливу досліджуваних ксенобіотиків у зимовий період. Значних відхилень вмісту цитохромів моноксигеназної системи печінки та білих м'язів коропа лускатого за умов інтоксикації натрій лаурилсульфатом в порівнянні з СМЗ на виявлено.

Вказані зміни цитохрому P-450, ймовірно, зумовлені активацією процесів перекисного окиснення ліпідів в мікросомах, що спричиняє деградацію молекул цитохрому P-450. Зниження вмісту цитохрому b5, можливо, пов'язане із порушеннями у функціонуванні електронно-транспортного ланцюга. Всі ці фактори могли призвести до розвитку оксидативного стресу.

СМЗ та натрій лаурилсульфат знижують активність НАДФН-генеруючих дегідрогеназ печінки та білих м'язів коропа. Результати проведених досліджень дозволяють встановити, що в осінній період до інтоксикації більш схильні ферменти моноксигеназної системи печінки, де виявлено зниження активності на 19,3% (Г-6-ФД) та 24,5% (6-ФГД), в порівнянні з білими м'язами, де зміни становлять 12,3% та 13,9% відповідно. В зимовий період як натрій лаурилсульфат, так і синтетична миюча речовина здійснюють більш значний вплив на ферменти білих м'язів, зокрема активність Г-6-ФД знизилась на 43,2%, а 6-ФГД – на 27,1%, в той час як у печінці зміни становлять 11,1% та 15,5% відповідно. Можливо, це викликано порушенням ліпідного обміну та руйнівним впливом на моноксигеназні системи, що спричинило інтоксикацію організму риб під час переходу у зимовий стан спокою.

Висновки

1. Застосовані в проведеному експерименті концентрації синтетичного миючого засобу спричиняють значне зменшення вмісту цитохромів P-450 та b5 в печінці та білих м'язах коропа лускатого у зимовий період.
2. Активність НАДФН-генеруючих ферментів печінки за умов інтоксикації синтетичним миючим засобом значно знижується в осінній період, НАДФН-генеруючих ферментів моноксигеназної системи білих м'язів – в зимовий період.
3. Вміст цитохромів P-450 і b5 у тканинах печінки та білих м'язів коропа лускатого за умов інтоксикації натрій лаурилсульфатом знижується в усіх дослідних групах в порівнянні з контролем. У печінці зменшення вмісту цитохромів значно більше, ніж у тканинах білих м'язів.

Список літератури

- Вернигорова В.Н., Макридин Н.И., Соколова Ю.А., Максимова И.Л. Химия загрязняющих веществ и экология. – М.: Изд-во «Палеотип», 2005. – 240с. /Vernigorova V.N., Makridin N.I., Sokolova Yu.A., Maksimova I.L. Khimiya zagryaznyayushchikh veshchestv i ekologiya. – M.: Izd-vo «Paleotip», 2005. – 240s./
- Галкін Б.М., Філіпова Т.О. Цитохроми P-450: Загальні та еволюційні аспекти // Мікробіологія і біотехнологія. – 2010. – №3. – С. 8–20. /Galkin B.M., Filipova T.O. Tsytochromy R-450: Zagal'ni ta evolyutsiyni aspekty // Mikrobiologiya i biotekhnologiya. – 2010. – №3. – S. 8–20./

- Гандзюра В.П. Продуктивність біосистем у токсичному середовищі. Автореф. дис. ... докт. біол. наук. – Чернівці, 2004. – 34с. /Gandzyura V.P. Produktivnist' biosystem u toksichnomu seredovyschi. Avtoref. dys. ... dokt. biol. nauk. – Chernivtsi, 2004. – 34s./
- Герман А.В. Рыбы как биоиндикаторы загрязнения водоемов органическими веществами // Актуальные проблемы водохранилищ. Мат. Всерос. конф. – Ярославль, 2002. – С. 57–58. /German A.V. Ryby kak bioindikatory zagryazneniya vodoyemov organicheskimi veshchestvami // Aktual'nyye problemy vodokhranilishch. Mat. Vseros. konf. – Yaroslavl', 2002. – S. 57–58./
- Головенко Н.Я., Карасева Т.Л. Сравнительная биохимия чужеродных соединений. – К.: Наукова думка, 1983. – 200с. /Golovenko N.Ya., Karaseva T.L. Sravnitel'naya biokhimiya chuzherodnykh soyedineniy. – K.: Naukova dumka, 1983. – 200s./
- Жаркова И.М., Кобегенова С.С. Длительное воздействие СМС на внутренние органы *Danio rerio* // Вестник КазНУ, 2003. – Т. 59, №3. – С. 500–503. /Zharkova I.M., Kobegenova S.S. Dlitel'noye vozdeystviye SMS na vnutrenniye organy *Danio rerio* // Vestnik KazNU, 2003. – T. 59, №3. – S. 500–503./
- Кржечковская В.В. Мембрансвязанный цитохром b5. Роль цитохрома b5 в регуляции активности изоформ цитохрома P-450 // Серия. Критические технологии. Мембраны. – 2005. – №2 (26). – С. 10–22. /Krzhechkovskaya V.V. Membransvyazannyi tsitokhrom b5. Rol' tsitokhroma b5 v regulyatsii aktivnosti izoform tsitokhroma R-450 // Seriya. Kriticheskiye tekhnologii. Membrany. – 2005. – №2 (26). – S. 10–22./
- Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Горохов А.Г. и др. Микросомальное окисление в физиологических и патологических процессах // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – №4 (56). – С. 170–180. /Kuznetsova E.E., Gorokhova V.G. i dr. Mikrosomal'noye okisleniye v fiziologicheskikh i patologicheskikh protsessakh // Byulleten' VSNTS SO RAMN. – 2007. – №4 (56). – S. 170–180./
- Куценко С.А. Основы токсикологии. – М.: Фолиант, 2004. – 570с. /Kutsenko S.A. Osnovy toksikologii. – M.: Foliant, 2004. – 570s./
- Физиолого-биохимические и генетические исследования ихтиофауны Азово-Черноморского бассейна. Методическое руководство. – Ростов-на-Дону: Эверест, 2005. – 105с. /Fiziologo-biokhimicheskiye i geneticheskiye issledovaniya ikhtiofauny Azovo-Chernomorskogo basseyna. Metodicheskoye rukovodstvo. – Rostov-na-Donu: Everest, 2005. – 105s./
- Biochemica information. – Biochemica, Germany: Boehringer Mannheim GmbH, 1975. – Bd.1,2. – P. 99–100.
- Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.I., Randall R.I. Protein measurement with the Folin phenol reagent // Biol. Chem. – 1951. – Vol.193, №1. – P. 265–275.

Представлено: В.З.Курант / Presented by: V.Z.Kurant

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 07.05.2015