

Известно, что гематологические показатели, обладая высокой лабильностью, служат индикатором патологических процессов в организме. Тем не менее, неспецифичность реакции крови не позволяет точно определить источник измененного физиологического состояния. Для выявления некоторых закономерностей между интоксикацией организма рыб действующими веществами пестицидов и реакцией крови был проведен анализ на выявление связи обнаружения действующего вещества в печени с возникновением морфологических нарушений в красной крови. Следует сказать, что проведенный анализ не учитывал концентрацию веществ в печени, а лишь его наличие или отсутствие.

Было выявлено, что в ряде случаев наблюдается зависимость между анализируемыми признаками (вещество-нарушение красной крови). В парах признаков Дикамба-коагуляция, Клопиралид-коагуляция, Пенцикурон-гипохромазия, Ципроконазол-гипохромазия, Тебуконазол-смещение ядер эритроцитов обнаружена тесная связь между обнаружением в печени пестицида и выявлением морфологических нарушений в крови. Таким образом, можно предположить, что некоторые действующие вещества при попадании в организм рыб могут увеличивать риск развития тех или иных нарушений морфологии эритроцитов.

Анализ токсикологического состояния исследуемых видов рыб позволяет сделать заключение о том, что современный уровень пестицидного загрязнения акватории Азовского моря не оказывает выраженного негативного и лимитирующего воздействия на верхние, как правило, - самые уязвимые звенья трофических цепей. Тем не менее, несмотря на небольшую историю применения этих пестицидов в сельском хозяйстве, обнаружение их в тканях рыб является сигналом для актуализации мониторинговых наблюдений с целью предотвращения отрицательных влияний на количественные и качественные параметры экосистемы Азовского моря.

Токсический эффект длительного воздействия пиразоловых пестицидов на показатели функционального состояния нервной системы рыб

И.Л. Левина

Введение. Известно, что присутствие пестицидов в воде водоемов в концентрациях свыше 0,1 мкг/л продолжительное время оказывает угнетающее воздействие на ихтиофауну и вызывает серьезные

нарушения деятельности основных жизненных систем организма рыб задолго до их гибели. Молекулярными мишенями действия пестицидов могут быть $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФ}$ аза и ацетилхолинэстераза (АХЭ) мозга рыб, характеризующие функциональное состояние нервной системы. Определение активности этих ферментов служит весьма чувствительным биохимическим индикатором токсичности пестицидов, обладающих нервно-паралитическим действием, и имеет прогностическое значение.

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФ}$ аза (КФ 3.6.1.3) – фермент клеточной мембраны, который имеет важное значение для ионной и осмотической регуляции у пресноводных рыб. Угнетение активности $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФ}$ азы может приводить к нарушению проницаемости клеточных мембран для ионов натрия и калия, поскольку она избирательно выкачивает из клетки ионы натрия и аккумулирует в ней ионы калия, используя для этой работы энергию аденозинтрифосфата (АТФ) посредством его гидролиза. Создаваемая ферментом разница концентраций одновалентных катионов используется для протекания ключевых реакций жизнедеятельности – генерации возбуждения, водно-солевого обмена. Ассиметричное распределение одновалентных катионов важно и для формирования мембранного потенциала клетки, и для транспорта метаболитов через клеточную мембрану, и для регуляции внутриклеточных реакций обмена веществ (Болдырев, 1998). Поскольку АТФаза вовлекается в различные физиологические процессы, ее ингибирование пестицидами может приводить к значительному токсическому эффекту на клетку. Нервные клетки могут быть особенно поражены, т.к. небольшие изменения ионного состава, регулируемые АТФазой, изменяют нервную активность.

АТФаза представляет собой сложный белок, имеющий гидрофобную группу связывания с липидным матриксом, центр связывания для ионов натрия и калия, а также активный центр, где осуществляется гидролиз АТФ. Функциональная единица фермента состоит из двух полипептидных цепей: большей (альфа-субъединицы) и меньшей (бета-субъединицы). Меньшая субъединица пересекает мембрану только один раз, в то время как большая – много раз, образуя несколько петель, при этом оба конца пептидной цепи обращены в цитоплазму. Активный центр фермента обращен в цитоплазму и доступен для цитоплазматического АТФ. Центры связывания переносимых ионов локализованы в петле между второй и третьей спиралью, пронизывающими мембрану. Таким образом, альфа-субъединица может выполнять функцию насоса независимо от бета-субъединицы, хотя существует мнение, что бета-субъединица обеспечивает правильную ориентацию альфа-субъединицы

в мембране. Оба полипептида образуют компактную глобулу, насквозь пронизывающую мембрану (Muller, Gruber, 2003).

Таким образом, возможны два пути модуляции фермента. Первый - в случае тяжелых металлов, когда происходит конкурентное взаимодействие с активным центром и ингибирование транспорта катионов. Другой тип регуляции характерен для гидрофобных молекул органических веществ, в том числе различных пестицидов. Они могут присоединяться к определенной части молекулы фермента, изменяя ее конформацию и тем самым активность.

Подобный механизм описан в экспериментах с пиретроидами (Kakko et. al., 2003), фосфорорганическими соединениями (ФОС) (Мышкин и др., 1997) и инсектицидами, являющимися производными тиомочевины (Ruder, Kayser, 1994). В более ранних работах было показано, что многие хлорорганические пестициды, в том числе ДДТ, вызывали четко выраженное торможение активности $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ Фазы мозга, жабр, почек у морских, пресноводных и проходных рыб (Cutkomp et. al., 1971; Desaiyah et. al., 1975).

Главная физиологическая роль АХЭ (КФ 3.1.1.7) – разрушение ацетилхолина (АХ), нейромедиатора холинэргических синапсов в процессе передачи нервного импульса. Кинетические свойства АХЭ определяются конформационной структурой ее активного центра и составляющих его аминокислотных остатков. Каталитической единицей является глобулярная форма, в середине которой находится каталитический центр. Установлено, что активный центр состоит из двух функционально важных и пространственно разделенных участков: эстеразного, осуществляющего гидролиз эфирной связи субстрата, и холин-связывающего, который ориентирует молекулы субстрата относительно активного центра фермента (Моралев, Розенгарт, 1999). У АХЭ присутствует еще и периферический «анионный» пункт, наличие которого обуславливает эффект субстратного торможения при высоких концентрациях субстрата и взаимодействие со специфическими ингибиторами и активаторами фермента (Chatonnet, Lockridge, 1989). У рыб наибольшая активность АХЭ представлена в мозге, но также присутствует и в других органах и тканях, хотя в отличие от млекопитающих в эритроцитах она не обнаружена (Kozlovskaya et. al., 1993).

Надо отметить, что ингибирующее действие ФОС на активность АХЭ у теплокровных животных было установлено еще в 50-60-х годах. Позже были получены экспериментальные данные по воздействию 74 химических веществ различных структур, свидетельствующие о том, что

активность АХЭ у рыб и теплокровных может изменяться не только под влиянием ФОС, но и пестицидов других химических классов, в том числе хлорорганических (ХОС) и карбаматных. Исследования этого фермента при действии ХОС, ФОС, карбаматов на рыб продолжаются и в настоящее время. Установлено, что многие из них способны инактивировать активность АХЭ (Чуйко и др., 2005; Owen et. al., 2002; Denton et. al., 2003).

В связи с вышесказанным представляет интерес изучение уровня активности Na^+ - K^+ -АТФазы и АХЭ в мозговой ткани рыб при длительном воздействии представителей современного химического класса пестицидов - пиразолов, что и явилось целью наших исследований.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования служили сеголетки карпа (*Cyprinus carpio*). В опытах было использовано не менее 10 рыб на каждый вариант постановки. Рыб помещали в аквариумы с отстоянной аэрируемой водой, куда вносили растворы пестицидов. В качестве пиразоловых пестицидов использовали - гербицид Бутисан С 500 г/л, КС, д.в. Метазахлор ("БАСФ", Германия) и акарицид Ортус 50 г/л, СК, д.в. Фенпироксимат ("Томен Корпорейшн", Япония). Отборы проб проводили на 5-е, 10-е, 20-е и 30-е сутки экспериментов. Зрительные доли головного мозга гомогенизировали, добавляя 0,01 М трис-НСI буфер (рН 7,4), содержащий 0,32 М сахарозу. Определяли активность АХЭ (Козловская и др., 1984) и Na^+ - K^+ активируемой АТФазы мозга рыб (Казеннов и др., 1984). Активность всех ферментов рассчитывали на 1 мг белка, определяемого по методу Лоури.

Результаты и обсуждение. Исследование воздействия пестицидов на выживаемость рыб в острых опытах позволило определить среднетлетальные концентрации и установить, что гербицид Бутисан С среднетоксичен для рыб ($\text{ЛК}_{50} = 16,72$ мг/л), акарицид Ортус – особотоксичен ($\text{ЛК}_{50} = 0,11$ мг/л). Картина острого отравления Ортусом характеризовалась признаками нервно-паралитического характера. После стадии возбуждения отмечали угнетение двигательной активности, нарушение ориентации животных с последующей депрессией, у отдельных экземпляров наблюдались судороги. Клинические признаки отравления рыб гербицидом Бутисан С были менее выражены и не сопровождались нейротоксическими симптомами.

Диапазон исследованных концентраций в 30-ти суточном эксперименте составил для Бутисана С 500 г/л, КС (д.в. Метазахлор) 0,5-10,0 мг/л. Ортус 50 г/л, СК (д.в. Фенпироксимат) был исследован в диапазоне концентраций 0,001-0,025 мг/л.

Исследование активности $\text{Na}^+\text{-K}^+$ активируемой АТФазы головного мозга рыб показало, что акарицид Ортус оказывал ингибирующее действие на активность фермента в максимальной исследованной концентрации (0,025 мг/л) на протяжении 30 суток (рис. 1). Воздействие пестицида в концентрации 0,025 мг/л вызывало достоверное снижение активности фермента в среднем на 38-57 %. При этом у рыб отмечались признаки нервно-паралитического характера, что привело к гибели 60 % особей к 30-м суткам опыта. В меньшей концентрации Ортуса 0,01 мг/л активность фермента также несколько снижалась, но различия с контролем были недостоверны. Результаты эксперимента косвенно свидетельствуют о нарушении стабильности клеточных мембран в мозговой ткани, ионного гомеостаза и, в результате, осмотической регуляции у карпа.

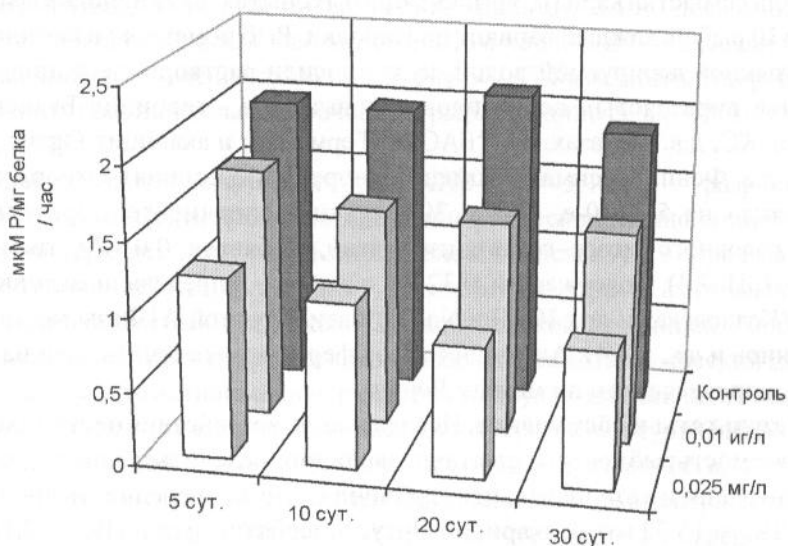


Рис. 1. Активность $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -АТФазы в мозге рыб после воздействия Ортуса 50 г/л, СК

Гербицид Бутисан С, обладающий меньшей степенью токсичности, приводил, наоборот, к увеличению активности $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -АТФазы в мозге рыб на 167-258 % только на 5-е сутки эксперимента в наибольших концентрациях 2,5 и 10,0 мг/л, при дальнейшей увеличении экспозиции активность фермента достоверно не отличалась от контроля во всех исследованных концентрациях (рис. 2). Мощное увеличение активности фермента в начале эксперимента может быть вызвано усилением энергетических затрат на механизмы антиоксидантной защиты для преодоления токсического действия пестицида.

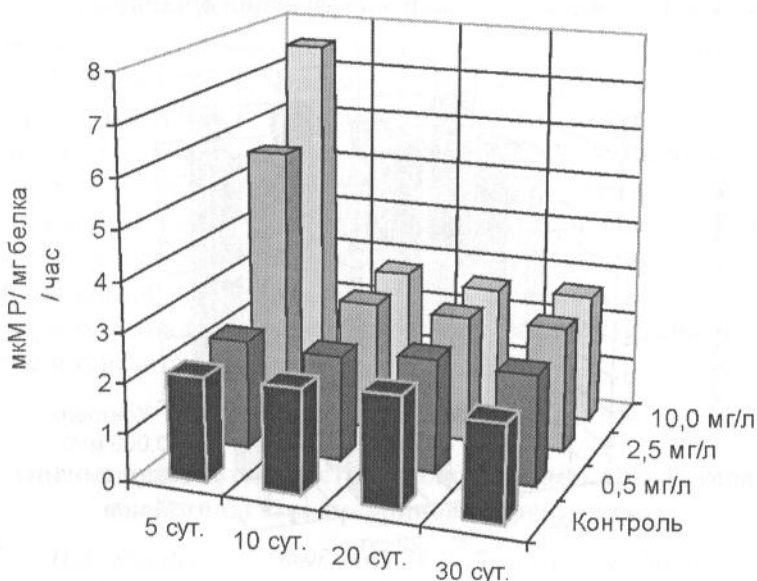


Рис. 2. Активность $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФазы}$ в мозге рыб после воздействия Бутисана С 500 г/л, КС

Следовательно, воздействие пиразоловых пестицидов приводило к ингибированию активности $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФазы}$ мозга рыб только в том случае, когда пестицид обладал нервно-паралитическим действием и высокой степенью токсичности для рыб (Ортус).

Акарицид Ортус проявлял также антихолинэстеразный эффект. Угнетение активности АХЭ на 24 % при действии Ортуса было зафиксировано уже на 5-е сутки экспозиции в максимальной концентрации 0,025 мг/л. На 10-е сутки опыта активность фермента снижалась в концентрациях 0,01-0,025 мг/л, процент изменений составлял в среднем 30 (рис. 3). К концу эксперимента активность АХЭ при действии Ортуса соответствовала контрольным значениям во всех концентрациях. Угнетение активности АХЭ происходило в наибольших сублетальных концентрациях акарицида, что указывает на изменение нормального функционирования нервной системы рыб.

Воздействие Бутисана С на активность фермента приводило к противоположному действию - происходило увеличение активности АХЭ в начале экспозиции на 5-е сутки в концентрациях 2,5 и 10,0 мг/л, хотя изменения показателя были более выражены и достигали 120 и 285 % (рис. 4). Увеличение активности АХЭ можно объяснить адаптивными

перестройками в организме рыб, связанными с увеличением уровня метаболизма и мобилизацией защитных функций организма.

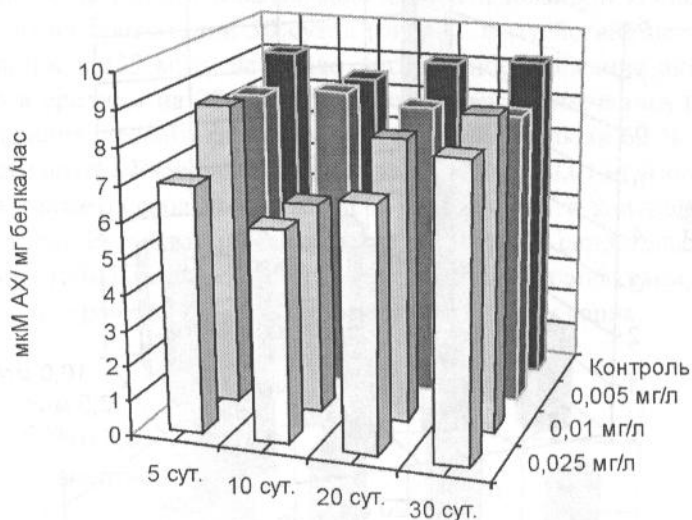


Рис. 3. Активность ацетилхолинэстеразы в мозге рыб после воздействия Ортуса 50 г/л, СК

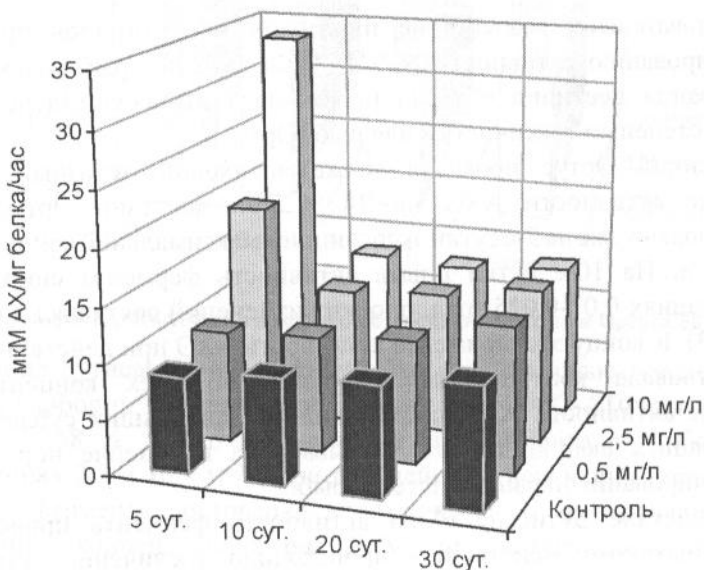


Рис. 4. Активность ацетилхолинэстеразы в мозге рыб после воздействия Бутисана С 500 г/л, КС

Таким образом, влияние пиразоловых пестицидов на активность ферментов АХЭ и $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФазы}$ мозга рыб отличалось по интенсивности и направленности токсического воздействия. Акарицид Ортус 50 г/л, СК (д.в. Фенпироксимат), который относится к классу особотоксичных пестицидов для рыб, проявлял нервно-паралитическое действие, приводил к угнетению активностей АХЭ и $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФазы}$ мозга рыб, нарушая тем самым функциональное состояние нервной системы и осмотическую регуляцию у рыб. Пиразоловый гербицид Бутисан С 500 г/л, КС (д.в. Метазахлор), обладающий меньшей степенью токсичности (среднетоксичный для рыб), увеличивал активность АХЭ и $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФазы}$, что, очевидно, является защитной реакцией организма рыб на действие токсиканта.

Оценка чувствительности зоопланктонных организмов к действию стробилуриновых фунгицидов

Н.А. Жердев, Е.С. Власенко, И.Л. Левина, О.А. Зинчук

Стробилурины являются новым IV поколением фунгицидов, которые начали использоваться в сельскохозяйственном производстве в XXI веке. Их поведение в водных экосистемах и степень токсического воздействия на гидробионтов не изучены.

Зоопланктонное сообщество - один из важнейших компонентов водных экосистем и является индикатором их состояния, что определяется функцией зоопланктона - фильтрация взвеси и ее трансформация (Лисицын, 2004). По численности в пресноводных водоемах преобладают ветвистоусые ракообразные, которые активно участвуют в процессах естественного самоочищения водоемов (Андроников, 1966). Высокая фильтрационная активность зоопланктонных организмов делает их наиболее уязвимой группой в составе водного сообщества при пестицидной интоксикации. Поэтому изучение влияния стробилуринов на физиологические процессы жизнедеятельности зоопланктонных организмов является необходимым условием обоснования безвредных уровней их содержания в воде рыбохозяйственных водоемов.

В связи с вышесказанным, целью нашей работы явилось установление порога чувствительности ветвистоусых ракообразных дафний (*Daphnia magna* Straus) к действию 2-х стробилуриновых фунгицидов, являющихся техническими продуктами (действующие вещества) – Трифлуксистробина и Пиракlostробина на основе изучения физиологических показателей