

УДК 574[64+24]:597.551.2

А. А. Жиденко

Черниговский государственный педагогический университет им. Т. Г. Шевченко

РОЛЬ КАТИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ФОРМИРОВАНИИ АДАПТИВНЫХ РЕАКЦИЙ К ГЕРБИЦИДАМ В ОРГАНИЗМЕ КАРПА (*CYPRINUS CARPIO*)

Показано вплив зенкору та раундапу на зміну концентрації катіонів кальцію в органах *Cyprinus carpio* L., а також можливість корекції обміну речовин і формування адаптації в цих умовах за допомогою Ca^{2+} . Зміни вмісту Ca^{2+} в органах коропа залежать від структурних ушкоджень органів, на ступінь важкості яких впливає природа гербициду (складність хімічного складу та розчинність у воді). Корекція обміну речовин у дволіток коропа в умовах гербицидного навантаження можлива за рахунок катіонів кальцію, які необхідно додавати у воду при контролі її *pH*.

A. A. Zhidenko

T. G. Shevchenko Chernigiv State Pedagogical University

ROLE OF CALCIUM CATIONS IN THE FORMATION OF ADAPTIVE REACTIONS TO HERBICIDES OF THE CARP (*CYPRINUS CARPIO*)

The influence of zenkore and round-up on changes of the calcium cations concentration in the *Cyprinus carpio* L., and the possibility of metabolism correction and adaptation under such condition due to Ca^{2+} are presented. Changes of the Ca^{2+} content in the carps' organs depend on the structural damages of the organs. The herbicides' characteristics (chemical structure and water solubility) influence on the intensity of damage. Ca^{2+} can correct the metabolism of carps of two years age under the herbicides load. So, the Ca^{2+} should be added into the water with simultaneous *pH* control.

Введение

В результате применения пестицидов возможны следующие пути их накопления: аккумуляция в живых организмах, почве, перенесение воздушным потоком и попадание в открытые водоемы [3]. Создается опасность для существования гидробионтов. Достаточно быстро на действие токсических веществ реагируют электролиты крови водных организмов, в частности ионы кальция и фосфора. Известно их участие во многих биохимических и физиологических процессах: кальций участвует в регуляции проницаемости клеточных мембран, электрогенезе нервной, мышечной и железистой тканей, процессах синаптической передачи, молекулярном механизме мышечного сокращения, развитии секреторного и инкреторного процессов пищеварительных и эндокринных желез, энергетическом обмене [12]. Кроме того, кальций является внутриклеточным посредником (вторичным мессенджером) ряда клеточных реакций: оказывает влияние на структурное состояние белков мембранного каркаса и на асимметричное распределение липидов в эритроцитарных мембранах [8]. При гипоксии, как было показано [9], происходит массивный вход Ca^{2+} в цитоплазму за счет активации плазмалемных кальциевых каналов. Высокая концентрация Ca^{2+} оказывает на клетку цитотоксическое действие, при меньших концентрациях возможен защитный эффект: вклю-

чение разных антиоксидантных комплексов и стимуляция продукции АТР [9]. Исходя из этого, для рыбы катионы кальция могут быть или протектором при токсических воздействиях, или, наоборот, усугублять действие антропогенных факторов в зависимости от своей концентрации и условий окружающей среды.

Цель нашей работы – оценить изменение содержания катионов кальция в органах двулеток карпа под действием зенкора и раундапа, а также выявить роль Ca^{2+} в формировании адаптации.

Материал и методы исследований

Исследование влияния гербицидов проведены на двулетках (150–300 г) карпа (*Cyprinus carpio* L.), выращенных в ОАО «Черниговрыбхоз». Опыты по изучению влияния гербицидов проводили в 200-литровых аквариумах, в которые рыбу размещали из расчета один экземпляр на 40 л воды. Длительность эксперимента – 14 суток. Замену воды проводили каждые 2–3 дня. Во всех случаях осуществляли контроль и поддерживали постоянный гидрохимический режим воды. Концентрацию исследуемых гербицидов, которая отвечала 2 ПДК, создавали путем внесения рассчитанных количеств 70 % порошка зенкора ($0,2 \text{ мг/дм}^3$) и 36 % водного раствора раундапа ($0,04 \text{ мг/дм}^3$). Кровь у рыб отбирали путем пункции сердца [5] на 7-е и 14-е сутки эксперимента. В сыворотке крови определяли содержание катионов кальция методом де Ваарда [13]. Для изучения структурных изменений в тканях карпа под влиянием гербицидов использовали метод гистологического исследования [6], для чего на 4-е, 7-е и 14-е сутки проводили патологоанатомический разрез рыбы и брали биопробы из органов – жабр и кишечника. Структурные изменения на гистопрепаратах фотографировали Web-камерой. Достоверное различие между средними арифметическими величинами определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Нами ранее показано [7], что поведенческие реакции сеголеток и двулеток карпа соответствуют изменению содержания фосфора в сыворотке крови. Кроме того, под действием гербицидов происходит разрушение структуры органов двулеток карпа и изменение содержания общих белков и их фракций в этих органах. Для проверки гипотезы о возможности коррекции обмена веществ у двулеток карпа, находившихся в условиях гербицидной нагрузки, за счет увеличения содержания кальция в воде и тем самым изменения концентрации катионов кальция в крови и органах были проведены исследования по определению содержания этого электролита. На рисунке 1 показаны изменения содержания катионов кальция в сыворотке крови контрольных рыб и рыб, находящихся в условиях гербицидной нагрузки.

На 7-е сутки эксперимента концентрация Ca^{2+} в сыворотке крови двулеток карпа под действием зенкора уменьшилась на 7,3 %, под действием раундапа увеличилась на 82,0 % по сравнению с контролем. Известно, что у пресноводных рыб вода и многие неорганические ионы, в том числе Ca^{2+} , абсорбируются аппаратом жабр, сразу поступают в общий кровоток, в то время как у морских рыб и наземных позвоночных в артериальной крови они появляются только после прохождения через печень. Исследуя утилизацию кальция из воды годовиками карпа, Н. П. Богоявленская установила [1], что 68–88 % меченого кальция проникает в организм через жабры и 12–32 % – через кожу. У рыб, имеющих чешуйчатый покров, через кожу утилизируется 12 %, а через жабры – 88 %.

Уже на 4-е сутки пребывания рыбы под воздействием зенкора (рис. 2) отмечают изменения формы респираторных ламелл жабр (выраженное колбообразное набуха-

ние, расширение дистальных участков жаберных филламентов и значительное увеличение объема клеток). Это способствует увеличению дистанции «кровь – среда» и уменьшению поступления токсического вещества, ослабляя прямое воздействие токсиканта. Поэтому и поступление катионов кальция из воды в организм рыб также снижается. Водопроводная вода в г. Чернигов относится к жесткой, в ней содержится 12 мг экв./л или 240 мг % солей кальция и магния (установлено санэпидстанцией и подтверждено нашими исследованиями). Под действием раундапа структурные изменения в жабрах проявляются лишь на 14-е сутки опыта (см. рис. 2), и они не столь значительны. Возможным объяснением является структура и свойства гербицида: зенкор – это метрибузин (4-амино-6-третбутил-3(метилтио)-1,2,4-триазин-5(4Н)-он), плохо растворимый в воде и хорошо – в метаноле, этаноле, ацетоне. Поэтому проникновение его в ткань жабр затруднено. Раундап – глифосат, фосулен (N-фосфонометилглицин) – наоборот, хорошо растворим в воде и плохо – в большинстве органических растворителей. Таким образом, поступление катионов кальция в организм рыб из воды возможно и содержание катионов кальция в крови карпа в условиях воздействия раундапа в 2 раза больше, чем под действием зенкора.

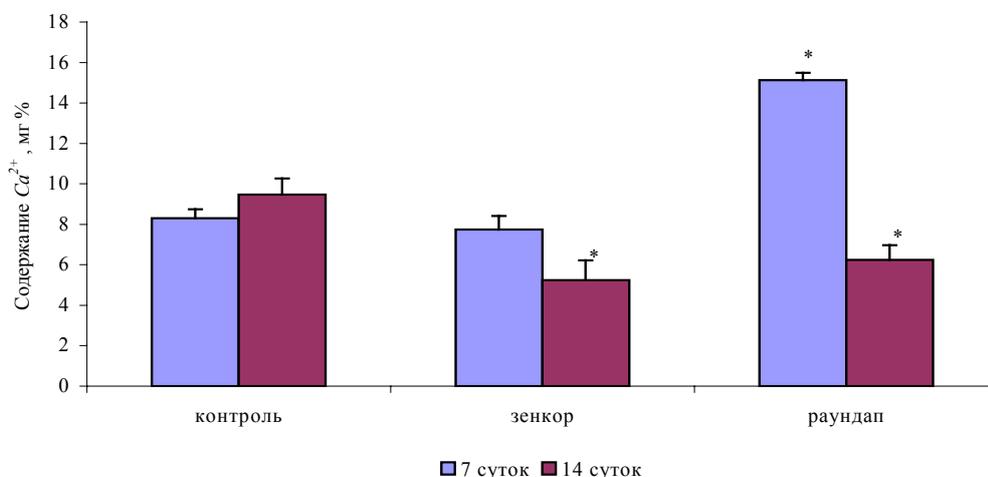


Рис. 1. Содержание Ca^{2+} ($M \pm m$, $n = 5$) в сыворотке крови двулеток карпа в условиях гербицидной нагрузки (2 ПДК)

Кроме того, имеет место второй путь увеличения содержания Ca^{2+} в крови карпа. Нами установлено [7], что одним из признаков воздействия раундапа на органы двулеток карпа является увеличение мягкости и гибкости костей рыб, просветление черепа. Известно, что содержание кальция в костях карпа существенно не отличается от его содержания в костях млекопитающих [14], поэтому резорбция костей черепа рыб приводит к тем же последствиям, что и у млекопитающих (увеличению содержания катионов кальция в крови). Благодаря интенсивному ионному обмену костная ткань является не только депо минеральных веществ, но и своеобразным буферным органом, участвующем в регуляции солевого гомеостаза кальция.

На 14-е сутки эксперимента (см. рис. 1) количество ионов кальция в сыворотке крови уменьшается под действием зенкора на 80,7 %, а под действием раундапа – на 51,5 % по сравнению с контролем. Объяснением может быть прогрессирующая гипертрофия дистальных участков филламентов, межклеточный отек, с выраженной деструкцией в респираторных ламеллах (зенкор, рис. 3) и нахождение в просвете кишечника камней карбоната кальция белого цвета (раундап, рис. 6). Кроме того, адсорбция кати-

онов из воды и их экскреция осуществляется у рыб специальными клетками, расположенными в жабрах. Доказано, что ионы кальция также могут не только абсорбироваться жабрами из воды, но и выделяться их железистыми клетками [19]. Нами был определен уровень ионов кальция в воде, где находились рыбы на 14-е сутки по окончании эксперимента. Необходимо учитывать, что вода в аквариумах постоянно обновлялась, и поэтому фактически в этой воде рыбы находились трое суток, то есть пополнение организма карпа Ca^{2+} возможно через водопроводную воду.

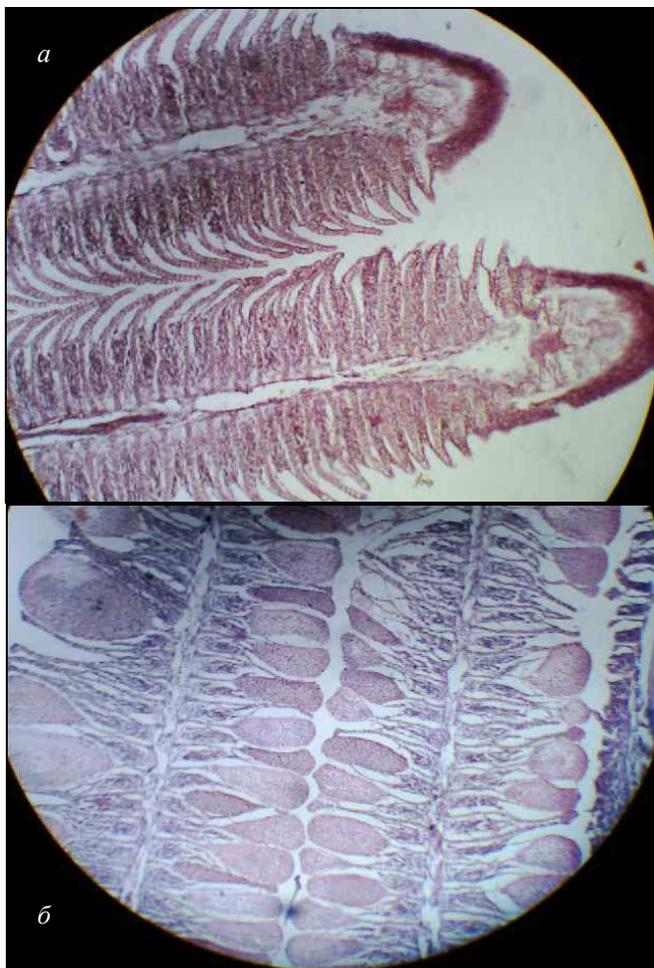


Рис. 2. Гистологические изменения в жабрах карпа под влиянием цинка:
а – контроль, **б** – 4-е сутки (x 40, гематоксилин-эозин)

Наименьшее количество ионов кальция (40 мг/л) было в воде, где содержались контрольные рыбы, жабры которых нормально функционировали и не имели морфологических повреждений (рис. 4). В опытах на золотой рыбке показано, что даже с увеличением количества усвоенного из пищи кальция заметно не уменьшается его поступление в результате прямой абсорбции из водной среды [15]. Поступающие из воды ионы кальция у водных животных уже в течение часа распределяются по всем органам и тканям. Наибольшее количество кальция обнаруживается в чешуе, костях жаберных крышек, осевом скелете рыб. Сравнительно меньшее его количество депонируется в мягких тканях. Значительное содержание кальция наблюдается в жаберных лепестках, то есть структурах, участвующих в его утилизации из воды [12]. Нами определено со-

держание Ca^{2+} в печени и мышцах двулеток карпа. В печени двулеток карпа под действием раундапа (2 ПДК) после 14 суток эксперимента уровень ионов кальция возрастает на 8 %, а в мышцах – снижается на 78,5 %.

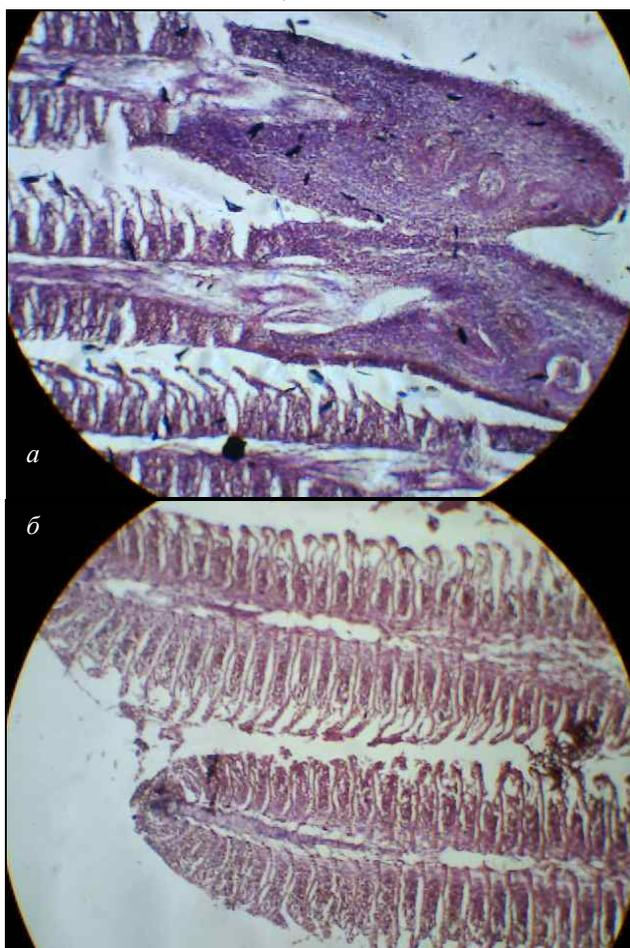


Рис. 3. Гистологические изменения в жабрах карпа под влиянием зенкора (а) и раундапа (б) на 14-е сутки (× 40, гематоксилин-эозин)

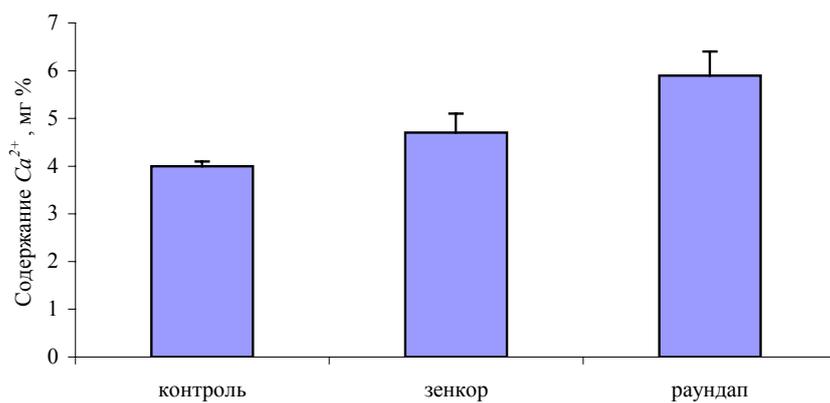


Рис. 4. Содержание Ca^{2+} в воде, где находилась рыба в условиях гербицидной нагрузки ($M \pm m, n = 5$)

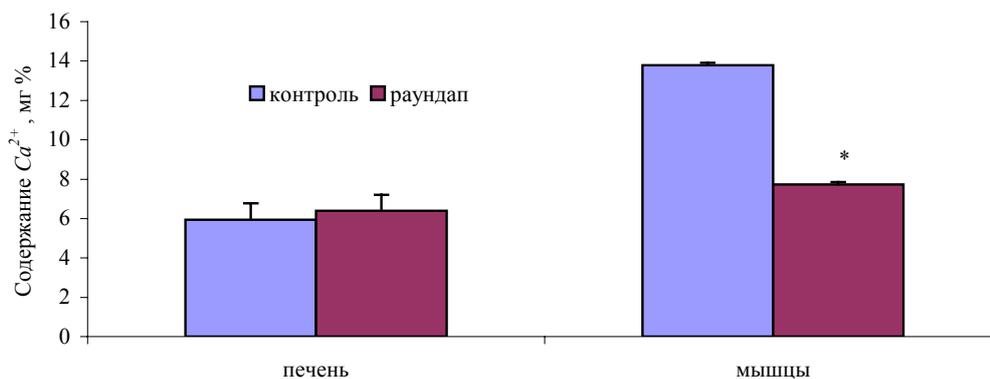


Рис. 5. Содержание Ca^{2+} ($M \pm m, n = 5$) в органах двулеток карпа под действием раундапа (2 ПДК)

Как показано нами [7], в гистопрепаратах скелетных мышц двулеток карпа, находившихся под воздействием раундапа, отмечается изменение структуры мышечных волокон, отсутствие поперечной полосатости, которая определяется белками Z-диска в некоторых их участках. Известно, что кальпаины гидролизуют белки миофибрилл или цитоскелета [2]. Кальпаины являются Ca^{2+} -зависимыми цистеиновыми протеазами с pH оптимумом 7,2–8,2. Кальпаины и их ингибитор – кальпастатин локализируются исключительно внутри клеток и преимущественно связаны с субклеточными органеллами, такими как миофибриллы скелетных мышц, везикулы аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума, плазматической мембраны. В общем, деградация внутриклеточных белков может идти по двум путям: лизосомальному и нелизосомальному.

Лизосомальный протеолиз в большей степени неселективен и отвечает в клетке за деградацию белкового материала трех категорий [10]. К нему относятся: а) экзогенные белки, поступающие в клетку из окружающей среды; б) эндогенные белки, являющиеся частью самой клетки; в) белковые гранулы, синтезируемые клеткой, но предназначенные для экскреции.

Нелизосомальные протеолитические системы включают: 1) АТФ- и убиквитин-зависимую протеолитическую систему, основным действующим элементом которой является мультисубъединичный белковый комплекс; 2) кальпаиновую систему или Ca^{2+} -зависимые протеазы и их эндогенный ингибитор кальпастатин [20]; 3) АТФ-независимые протеазы.

В эксперименте *in vitro* была протестирована способность различных двух- и трехвалентных катионов активировать кальпаины рыб: морского окуня и карпа. Показано, что Ca^{2+} является наиболее эффективным активатором (его эффективность принята за 100 %) [18]. В [7] нами показано уменьшение содержания общих белков и особенно нерастворимых, но увеличение водорастворимых по сравнению с контролем. Увеличение содержания эндогенного кальция приводит к активации кальпаинов, что, в свою очередь, способствует размягчению мышц и изменению качества рыбных продуктов [16]. При увеличении содержания внутриклеточного Ca^{2+} в пораженных мышцах происходит активация кальпаинов. Они инициируют деградацию миофибрилл, разрушают белки миофибрилл на фрагменты, которые поглощаются лизосомами и в них подвергаются дальнейшему расщеплению с участием катепсинов [11]. Снижение содержания катионов кальция в белых мышцах двулеток карпа на 14-е сутки нашего эксперимента объясняется активным вымыванием его из мышц в кровь, а затем отложением в виде камней карбоната кальция в кишечнике (рис. 6б).

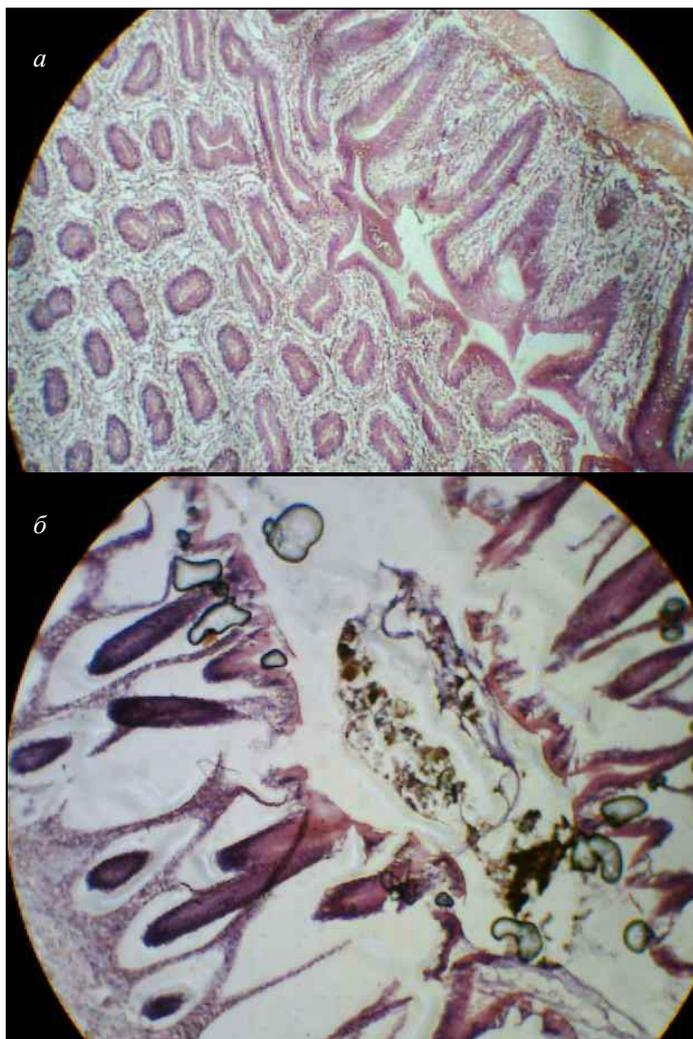


Рис. 6. Гистологический срез кишечника карпа (а – контроль), желчные конкременты и образования карбоната кальция в просвете кишечника карпа под влиянием раундапа (б) на 14-е сутки (× 40, гематоксилин-эозин)

Печень у рыб играет исключительно важную роль в регуляции кальциевого обмена [12], возможно, поэтому содержание Ca^{2+} в этом органе по сравнению с мышечной тканью под действием раундапа находится практически на одном уровне с контролем, хотя, как показано [7], в результате распространения процесса вакуольно-капельной дистрофии отмечается некроз гепатоцитов.

Поражение печени токсикантами различной природы сопровождается образованием очагов некроза, при этом из поврежденных гепатоцитов кальцаин «вытекает» и гидролизует белки плазматической мембраны соседних клеток, что приводит к прогрессии повреждения [17]. Подтверждением вышесказанного является уменьшение содержания общего белка в печени опытных рыб [7].

При увеличении гербицидной нагрузки до 4 ПДК тенденция изменений содержания катионов кальция та же, но количественные показатели выше на 33 % под действием зенкора и на 20 % – под действием раундапа (рис. 7).

Эксперимент по определению влияния раундапа для 2 ПДК на двулеток карпа проходил в октябре, а для 4 ПДК – в декабре. Возможно, поэтому так отличается содержание катионов кальция в печени контрольных рыб (рис. 8).

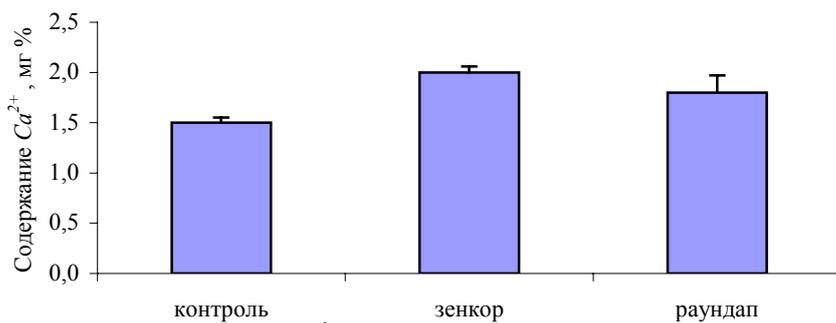


Рис. 7. Содержание Ca^{2+} ($M \pm m, n = 5$) в печени двулеток карпа в условиях гербицидной нагрузки (4 ПДК)

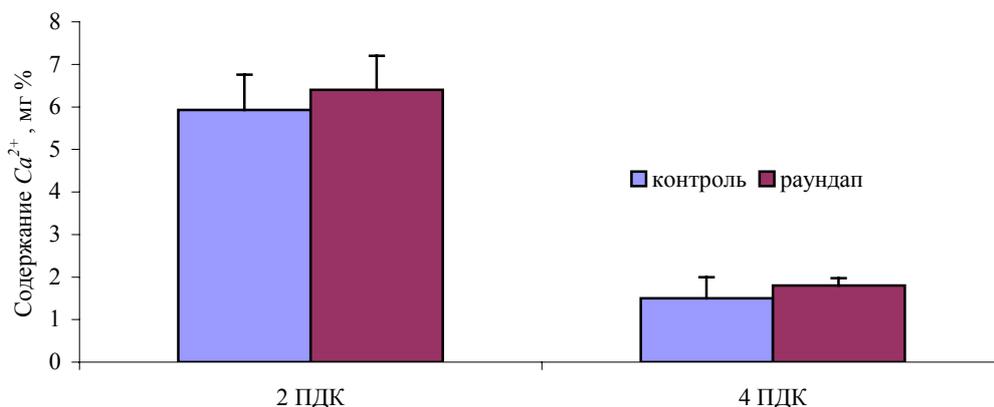


Рис. 8. Содержание Ca^{2+} ($M \pm m, n = 5$) в печени двулеток карпа в условиях гербицидной (2 ПДК, 4 ПДК) нагрузки

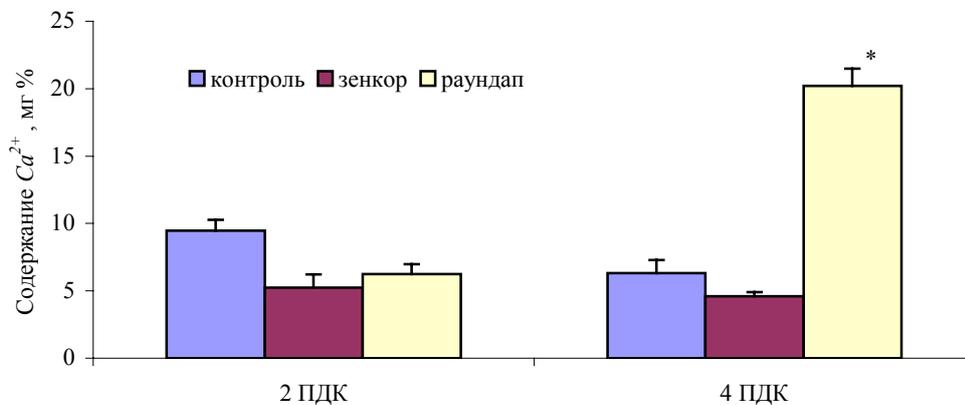


Рис. 9. Содержание Ca^{2+} ($M \pm m, n = 5$) в сыворотке крови двулеток карпа в условиях гербицидной нагрузки (2 ПДК, 4 ПДК)

Известно, что количество Ca^{2+} в организме водных животных зависит от условий среды обитания. Сезонное увеличение (в нашем случае осенний период) содержания Ca^{2+} в мышцах и гепатопанкреасе совпадает по времени с увеличением скоро-

сти роста и интенсивности питания рыб, так как температура воды в этот год была экстремально высокой +16...+18 °С. В сыворотке крови опытных рыб эта тенденция не соблюдается. При увеличении дозы токсического вещества в воде до 4 ПДК в сыворотке крови двухлеток карпа изменяется содержание катионов кальция в сторону увеличения. На 14-е сутки эксперимента концентрация Ca^{2+} в 3,2 раза больше в сыворотке крови при действии 4 ПДК раундапа по сравнению с 2 ПДК. Повышение содержания Ca^{2+} в сыворотке крови двухлеток карпа (20,2 мг %) на 14-е сутки эксперимента (4 ПДК) свидетельствует о незаконченности формирования долговременной адаптации. Таким образом, можно предположить, чем больше доза токсического вещества, тем дольше процесс адаптации.

Одним из важнейших условий, существенно влияющих на всасывание солей кальция, является их растворимость в воде и возможность быстрого перехода в ионизированную форму, облегчающую его транспорт через клеточную мембрану. Хлористый кальций, обладающий меньшей растворимостью, больше времени задерживается в организме, чем глюконат кальция. В водопроводной воде кальций и магний содержатся в виде бикарбонатов, кислых солей, хорошо растворимых в воде (карбонатная или временная жесткость). Кроме того, существует постоянная или некарбонатная жесткость, обусловленная присутствием хлоридов (растворимость в воде – 74,5 г) и сульфатов (0,176 г) кальция и магния в водопроводной воде [4].

Существование метаболической связи между интенсивностью дыхания и уровнем кальция в клеточных структурах предопределяет его влияние на биоэнергетические процессы в организме рыб. Известно его влияние [12] на аденозинтрифосфорную активность микросом мозга, ядер скелетных мышц, поэтому постоянное поступление этого катиона из окружающей водной среды в организм рыб способствует формированию долговременного этапа адаптации. При попадании гербицидов во внутренние водоемы необходимо немедленно проводить известкование прудов. При этом нужно учитывать величину почвенной кислотности дна пруда, которая определяется в хлоркалийевой вытяжке и обозначается символом *pHc*. Если *pH* грунта в солевой вытяжке ниже 6,0, то можно использовать негашеную известь (CaO), гашеную известь – $Ca(OH)_2$, известняк – $CaCO_3$, учитывая, что наибольшей скоростью действия обладает негашеная известь. Она нейтрализует также почвенную кислотность, из расчета 20 ц/га (при *pH* 4,0), гашеная известь имеет в 1,3, а известняк – в 1,8 раза меньшую нейтрализующую способность. Поэтому при *pH* 6,0 можно использовать 3 ц/га CaO , но лучше пользоваться пушонкой – тонкодисперсным порошком $Ca(OH)_2$ – 3,5 ц/га. Если же *pH* выше 6,0, то лучше использовать известняк. В летнее время рекомендуется вносить известь по воде из расчета 2–3 ц/га. Катионы кальция, попадая из воды в организм рыб, создадут определенную концентрацию их в крови и органах.

Таким образом, благодаря увеличению содержания катионов кальция в органах рыб, возможно возрастание активности процессов окислительного фосфорилирования и синтеза макроэргических соединений для успешного формирования адаптации. Кроме того, повышение активности кальпаиновой системы приведет к быстрому лизированию поврежденной ткани.

Выводы

Изменение содержания катионов кальция в органах карпа зависит от структурных повреждений органов, на степень тяжести которых влияет природа гербицида (сложность химического состава и растворимость в воде). Коррекция обмена веществ у

двулеток карпа в условиях гербицидной нагрузки возможна за счет катионов кальция, которые необходимо добавлять в воду при контроле ее *pH*.

Библиографические ссылки

1. **Богоявленская М. П.** Возможность использования Ca^{45} в качестве метки рыб // Рыбн. хоз-во. – 1955. – № 11. – С. 50–51.
2. **Бондарева Л. А.** Внутриклеточная Ca^{2+} -зависимая протеолитическая система животных / Л. А. Бондарева, Н. Н. Немова, Е. И. Кяйвярайнен. – М. : Наука, 2006. – 294 с.
3. **Врочинский К. К.** Гидробиологическая миграция пестицидов / К. К. Врочинский, М. М. Телитченко, А. И. Мережко. – М. : Изд-во Моск. ун-та, 1980. – 120 с.
4. **Гороновский И. Т.** Краткий справочник по химии / И. Т. Гороновский, Ю. П. Назаренко, Е. Ф. Некряч. – К. : Наукова думка, 1987. – 829 с.
5. **Давыдов О. Н.** Патология крови рыб / О. Н. Давыдов, Ю. Д. Темниханов, Л. Я. Куровская. – К. : Инкос, 2006. – 206 с.
6. **Евгеньева Т. П.** Гистологические методы в экспериментальной зоологии. – М. : Наука, 1983. – 40 с.
7. **Жиденко А. А.** Влияние гербицидов на структурный метаболизм карпа (*Cyprinus carpio* L.) разного возраста // Вісник Харківського національного ун-ту ім. В. Н. Каразіна. Серія біологія. – 2008. – Вип. 6, № 788. – С. 86–92.
8. **Костин Д. Г.** Влияние ионов кальция на транспорт конъюгатов глутатиона в эритроцитах человека / Д. Г. Костин, Н. М. Козлова // Укр. біохім. журн. – 2002. – Т. 74, № 4а. – С. 48.
9. **Костюк П. Г.** Ca^{2+} – один з основних регуляторів внутрішньоклітинних процесів // IX Українськ. біохім. з'їзд. Тез. доп. – Х. : НАН України, 2006. – Т. 1. – С. 9–10.
10. **Немова Н. Н.** Внутриклеточные протеиназы в эколого-биохимических адаптациях у рыб : Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 1992. – 42 с.
11. **Немова Н. Н.** Биохимическая индикация состояния рыб / Н. Н. Немова, Р. У. Высоцкая. – М. : Наука, 2004. – 215 с.
12. **Романенко В. Д.** Кальций и фосфор в жизнедеятельности гидробионтов / В. Д. Романенко, О. М. Арсан, В. Д. Соломатина. – К. : Наукова думка, 1982. – 152 с.
13. **Ронин В. С.** Руководство к практическим занятиям по методике клинических лабораторных исследований / В. С. Ронин, Г. М. Старобинец, Н. Д. Утевский. – М. : Медицина, 1977. – 335 с.
14. **Русанов В. В.** Возрастные изменения содержания кальция Ca в костях и чешуе карпа // Изв. НИИ озерн. и речн. рыб. хоз-ва. – 1974. – Т. 92. – С. 145–147.
15. **Berg A.** Studies on the metabolism of strontium in freshwater fish. II. Relative contribution of direct and intestinal absorption in growth conditions // Met. Ist. Ital. Idrobiol. – 1970. – Vol. 23, N 1. – P. 26.
16. **Isolation and *in vitro* characterization of the calpains from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle and their role in texture development / M. Salem, P. B. Kenney, J. Killefere, J. Nath // J. Muscle Foods. – 2004. – Vol. 15. – P. 245–255.**
17. **Mehendale H. M.** Calpain: a death protein that mediates progression of liver injury / H. M. Mehendale, P. B. Limaye // Trends Pharmacol. Sci. – 2005. – Vol. 26, N 5. – P. 232–236.
18. **Milli-calpain from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) white muscle: purification, characterization of its activation *in vitro* / C. Latrat, V. Verrez-Bagnis, J. Noel, J. Freurence // Mar. Biotechnol. – 2002. – Vol. 4, N 1. – P. 51–62.**
19. **Rosenthal Y. L.** Accumulation of strontium-90 and calcium-45 by fresh water fishes // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1960. – Vol. 104. – P. 88–91.
20. **The calpain system / D. E. Goll, V. F. Thompson, H. Li et al. // Physiol. Rev. – 2003. – Vol. 83, N 3. – P. 731–801.**

Надійшла до редакції 16.03.2009