БІОХІМІЯ

УДК 597.551.2:632.95 doi: 10.25128/2078-2357.21.4.5

О. І. БОДНАР, І. ХАТІБ, О. І. ГОРИН, О. В. СОРОКА, Х. І. НІМКО, І. В. ЧЕРНІК, Г. Б. КОВАЛЬСЬКА, Г. І. ФАЛЬФУШИНСЬКА

Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027
e-mail: bodnar@tnpu.edu.ua

ПРОЯВИ ОКИСНОГО СТРЕСУ ТА МЕТАБОЛІЧНИХ ПОРУШЕНЬ У *DANIO RERIO* ЗА ДІЇ ФОСФООРГАНІЧНИХ ПЕСТИЦИДІВ

Метою даної роботи було вивчення впливу раундапу та малатіону в екологічно релевантних та субтоксичних концентраціях на метаболічні процеси в коропової рибки *Danio rerio*. Доведено, що раундап викликав активацію каталази, протеїнфосфатази та каспази 3, тоді як малатіон – лише каспази 3. Водночас, досліджувані органофосфатні пестициди викликали порівняно з контролем помітне зниження глутатіонтрансферази та сукцинатдегідрогенази, особливо за дії малатіону. Також, за впливу малатіону було відзначено зниження активності протеїнфосфатази і каталази. Субтоксична концентрація раундапу зумовлювала активацію глутатіонредуктази, а екологічно реальна концентрація малатіону – її пригнічення. За сумою показників, малатіон викликав більш помітні токсичні прояви у даніо, ніж раундап. Відтак, органофосфатні пестициди несуть суттєві ризики токсичного впливу на риб як нецільових організмів, що важливо враховувати при виборі агротехнічного догляду за врожаєм та потенційною небезпекою щодо навколишнього середовища.

Ключові слова: органофосфатні пестициди, ензими, токсичність, Danio rerio.

Сукупність сучасних антропогенних чинників навколишнього середовища обумовлює суттєве зменшення біорізноманіття водних організмів та деградації водних екосистем. Серед цих чинників чільне місце займає інтенсифікація сільського господарства, включаючи застосування добрив та пестицидів. Власне, пестициди та продукти їх біодеградації є тією рушійною силою, яка здатна змінювати не лише цільові об’єкти, а й супутньо впливати на нецільові компоненти біоценозів, гідроекосистем та біосфери загалом [6, 9]. Зазначимо, що важливою умовою застосування пестицидів є їхня безпека, ефективність та селективна дія проти певних організмів-шкідників, без токсичного впливу щодо інших видів. Водночас, при порушенні регламенту зберігання, використання та дозування більшість пестицидів втрачають свою вибірковість, стають токсичними і завдають істотної шкоди навколишньому середовищу, забруднюючи ґрунт та поверхневі води, руйнуючи трофічні ланцюги екосистем, що в результаті несе загрозу і небезпеку для багатьох інших нецільових організмів та людини, яка є кінцевим споживачем [11, 12, 15].

Відтак, вплив пестицидів на гідробіонтів розглядається з особливою увагою як нецільових організмів, позаяк вони є одними з найважливіших ланок світової трофічної піраміди та визначають первинну продукційність біосфери. Окрім цього, водні організми забезпечують підтримку гомеостазу та енантіостазу гідроекосистем та становлять значний комерційний інтерес у господарській діяльності людини [2, 9].

Варто зауважити, що Україна входить до двадцятки країн світу з найбільшим використанням пестицидів [4, 15]. Тому виникає потреба в систематичних дослідженнях та аналізі впливу цих хімічних сполук та продуктів їх біотрансформації на процеси життєдіяльності гідробіонтів, що дозволить розширити та оптимізувати методи збереження біорізноманіття й підтримання продуктивності водних систем на належному рівні [3, 4, 26].

Зазначимо, що аналіз наукових досліджень пестицидів різних класів і токсичності з використанням коропової рибки *D. rerio* як лабораторного об'єкту показав, що ці сполуки викликають широкий спектр біологічних ефектів у смугастого даніо. За дії пестицидів у водному середовищі відбувається зміна енергетичного метаболізму, генерація окисного стресу, нейромоторні та ендокринні розлади, порушення ембріогенезу та ранніх стадій онтогенезу, активно розвиваються апоптичні процеси у тканинах тощо [12, 16, 22].

З огляду на зазначене, метою роботи було вивчення впливу раундапу та малатіону як широковживаних органофосфатних пестицидів, в екологічно релевантних та субтоксичних концентраціях на метаболічні процеси коропової рибки *Danio rerio*.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводились на дорослих особинах даніо (*Danio rerio*), родина Коропових, які були отримані від комерційного об'єднання «Зоосвіт». Тварин аклімували до лабораторних умов протягом 7 діб. Експериментальні умови створювали у басейнах об'ємом 10 л з кількістю риб з розрахунку 1 особина на 2 л води згідно загальноприйнятої схеми токсикологічного експерименту. Вміст кисню у воді підтримували на рівні 7,0–8,0 мг/л, вуглекислого газу – 2,2–2,8 мг/л, pH – 7,6-8,0. Воду відстоювали і змінювали через кожні дві доби, поновлюючи в експериментальних групах вміст досліджуваної сполуки у воді. Температура води становила 18±0,5 °C. Тварин годували подрібненим комерційним кормом Акваріус (Україна).

Для виконання поставлених завдань було сформовано п'ять груп тварин. Перша група – тварини контрольної групи, які утримувалися за вище зазначених умов. Трьом іншим групам у воду додавали раундап у концентраціях 10 мкг/дм^3 (RL) і 400 мкг/дм^3 (RH) та малатіон – у концентраціях 6 мкг/дм^3 (ML) і 60 мкг/дм^3 (MH). Концентрації чинників відповідали діапазону їх концентрацій у поверхневих водах або місцях скиду побутових стоків із полів [2, 9, 11, 15, 27]. Інкубація тварин тривала 14 діб. Експерименти на тваринах проводились у відповідності до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1986), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000) та рішення етичної комісії Тернопільського національного педагогічного університету (Протокол № 2, 2020). Тварин умертвляли під етерним наркозом. Процедури з відбору і обробки тканини проводили на холоді. Усі реактиви були від фірми ТОВ «НВФ «Сінбіас»»(Китай) і мали кваліфікацію «хч».

Методи визначення біомаркерів у тканинах даніо детально описані у Polymethoxy-1-alkenes screening of *Chlorella* and *Spirulina* food supplements coupled with in vivo toxicity studies [14]. Активність глутатіонтрансферази (GST) [КФ 2.5.1.18] визначали спектрофотометрично за утворенням адуктів 1-хлоро-2,4-динітробензену з глутатіоном із використанням мілімолярного коефіцієнту екстинкції забарвленого комплексу ε_{340}= 9.6 мМ $^{-1}$ см $^{-1}$ [13]. Активність протеїн тирозинової фосфатази (PP) [КФ 3.1.3.48] визначали спектрофотометрично з використанням n-нітрофенолфосфату [18]. Визначення активності сукцинатдегідрогенази (SDH) [КФ 1.3.5.1] проводили фероціанідним методом, який базується на швидкості окислення сукцинату до фумарату фероціанідом калію після добавляння сукцинату [8]. Активність каталази (CAT) [КФ 1.11.1.6] визначали в супернатанті гомогенату тканин печінки (1:10 вага: об'єм) за зменшенням у суспензії вмісту перекису водню за довжини хвилі 240 нм [1]. Активність глутатіонредуктази (GR) [КФ 1.8.1.7] виміряли за швидкістю окислення НАДФН за 340 нм [14]. Активність каспази-3 (Casp3) [КФ 3.4.22.56], яка активує апоптичні процеси в клітині, аналізували за кількістю вивільненого *p*-нітроаніліну (*p*NA) в реакційній суміші при 405 нм [5, 10].

Аналіз отриманих біологічних показників здійснювали з допомогою комп'ютерних програм Statistica v 12.0 та Exel для Windows-2016.

Результати досліджень та їх обговорення

Експозиція *Danio rerio* в присутності малатіону та раундапу обумовила суттєвий вплив на метаболічний статус риб. Аналіз отриманих результатів засвідчив, що в даніо за присутності екологічно реальних концентрацій раундапу і малатіону відбувалося загальне пригнічення антиоксидантного статусу організму на тлі інгібування енергетичних процесів (рис. 1–4). При цьому малатіон викликав помітніші зміни, ніж раундап, і ці зміни стосувалися переважно зниження активності досліджуваних езимів. Зокрема, за дії малатіону щодо контролю було відмічене зменшення активності сукцинатдегідрогенази майже на 80 %, глутатіонтрансферази – на 70 %, глутатіонредуктази – на 35 % відповідно.

Окрім цього, за дії раундапу в обох концентраціях виявлено, що глутатіонтрансферазна активність у печінці риб знизилася майже на 40 %, тоді як лише за дії вищої концентрації цього пестициду мало місце інгібування сукцинатдегідрогенази (на 21 % порівняно з контрольним показником). Нижча концентрація раундапу (10 мкг/дм^3) практично не викликала істотних змін активності SDH і GR, що, очевидно, свідчить про вищу стресостійкість окремих ланок метаболізму в *Danio rerio* за певних умов навколишнього середовища [23, 25, 28].

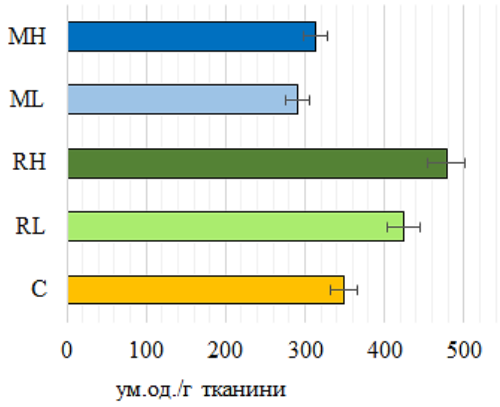

Рис. 1. Активність каталази в *D. rerio* за дії низьких і високих концентрацій раундапу і малатіону.

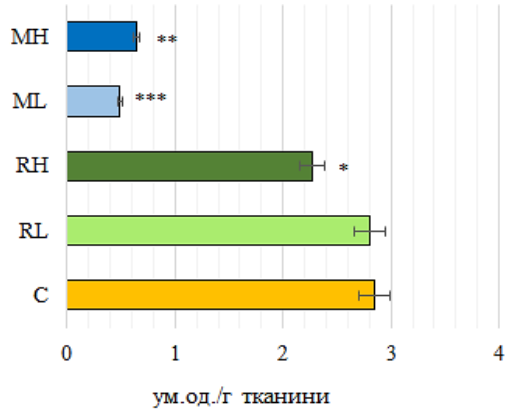

Рис. 2. Активність сукцинатдегідрогенази в *D. rerio* за дії низьких і високих концентрацій раундапу і малатіону.

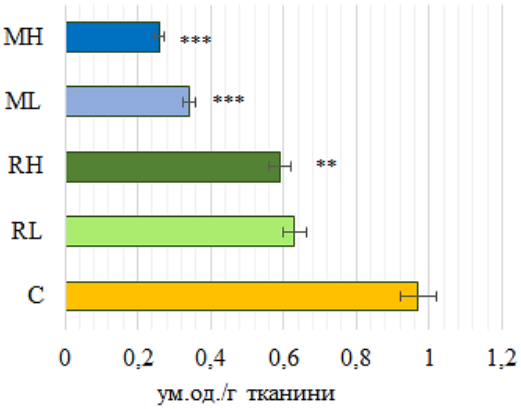

Рис. 3. Активність глутатіонтрансферази в *D. rerio* за дії низьких і високих концентрацій раундапу і малатіону.

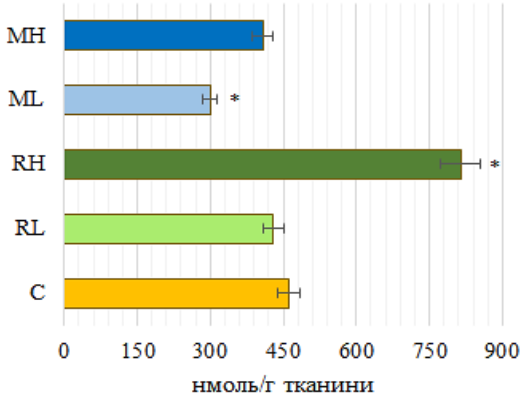

Рис. 4. Активність глутатіонредуктази в *D. rerio* за дії низьких і високих концентрацій раундапу і малатіону.

Водночас, раундап, особливо за дії вищої концентрації, викликав у даніо збільшення активності каталази (на 37 %) та глутатіонредуктази (на 77 %), порівняно з контрольною групою, що, можливо, є захисним механізмом *D. rerio* для запобігання розвитку апоптичних процесів, про які свідчить активація каспази та протеїнфосфатази (рис. 5 та 6). Очевидно, збільшення активності каталази можна прийняти як захисну реакцію на вплив субхронічних концентрацій пестицидів, яка зникає при зростанні забруднення. Однак, незважаючи на паралельне зниження активності ензимів енергетичного забезпечення та антиоксидантного статусу за дії малатіону, зниження протеїнфосфатази за цих умов не спостерігалося, що є одним із показників стабільності протеїнового пулу в організмі риб (рис. 5).

Активність каспази-3 як ключового ензиму апоптозу зростала у більшості досліджуваних груп тварин, за виключенням ML-групи (рис. 6).

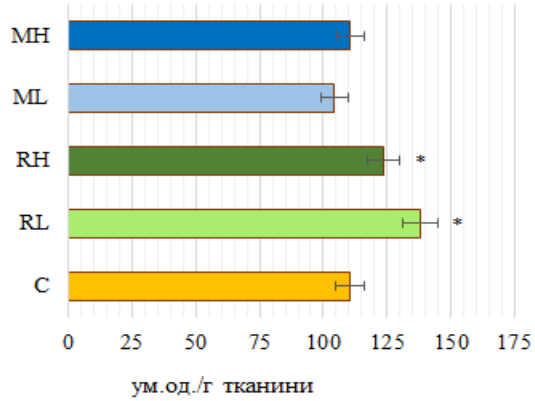

Рис. 5. Активність протеїнфосфатази в *D. rerio* за дії низьких і високих концентрацій раундапу і малатіону.

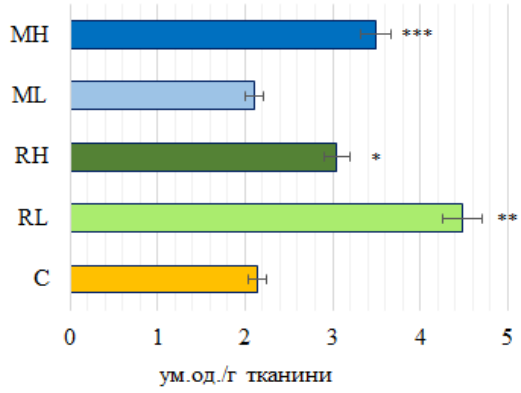

Рис. 6. Активність каспази-3 в *D. rerio* за дії низьких і високих концентрацій раундапу і малатіону.

Варто зазначити, що автори більшості наукових робіт підкреслюють роль пестицидів в активації окисного стресу для організмів різної екологічної ролі і систематичного положення [7, 17, 20, 21, 24, 26], що узгоджується із отриманими нами даними. Зокрема, гліфосат викликав зниження експресії генів супероксиддисмутази 2 (sod2), глутатіон S-трансферази (gstπ) та глутатіонпероксидази (gpx) узгоджено із пригніченням їх активності в смугастого даніо [29]. Також, гліфосат викликав збільшення активності каталази та зменшення глутатіонтрансферази в риб *Anabas testudineus* та *Heteropneustes fossilis*, що одночасно супроводжувалося зниженням кількості загального протеїну [14, 17]. Подібні зміни були відзначені і в коропа за дії малатіону (Yonar та ін.). Більше того, окисний стрес супроводжувався змінами протеїнового складу крові та активності ензимів протеїнового метаболізму [19]. Не менш небезпечним за даними авторів [27] є продукт розпаду гліфосату – амінометилфосфонова кислота (АМФК), яка на рівні з основною речовиною провокує у водних організмів порушення росту і раннього розвитку, окисний стрес, інгібування антиоксидантних ензимів, гематологічні та гістопатологічні зміни. Тому недотримання регламенту використання пестицидів на основі гліфосату може мати синергічний ефект дії [3, 27].

Варто зазначити, що при дослідженні пестициду токсафену на *Danio rerio* було відмічене суттєве зниження процесів окисного фосфорилювання, підвищення експресії генів протеїнів теплового шоку та часткові зміни в рівнях експресії каспази 3 і 9, які характеризувалися концентраційно-часовою залежністю [23], що теж відповідає отриманому нами результату – зниження активності сукцинатдегідрогенази, яка об'єднує у клітині ключовий енергетичний цикл Кребса та електронно-транспортний ланцюг і забезпечує належне енергоутворення у клітині. Бо ефективне функціонування енергетичних систем є важливим критерієм успішного формування адаптаційних стратегій організмів за дії токсичних чинників навколишнього середовища.

Таким чином, наші дослідження підкреслюють важливість систематичного вивчення впливу пестицидів різних класів на водні організми для отримання ефективних та неспецифічних біомаркерів токсичної дії щодо проявів окисних процесів, зміни активності ензимів антиоксидантного захисту, енергетичного метаболізму та апоптозу, що дозволить більш точно прогнозувати оцінки стану стабільності і виживаності популяцій риб та екосистеми загалом.

Висновки

Отже, дія екологічно реальних концентрацій раундапу та малатіону викликала в смугастого даніо пригнічення системи антиоксидантного захисту, узгоджено з підвищенням активності протеїнфосфатази та каспази-3. Вплив пестицидів, особливо малатіону, обумовив інгібування сукцинатдегідрогенази – спільного ензиму циклу Кребса та електронно-транспортного ланцюга, що в результаті негативно впливатиме на енергетичний баланс клітин. За сумою показників малатіон є більш токсичним для *D. rerio*, ніж раундап. Отримані показники важливо враховувати при доборі агротехнічного догляду за врожаєм та можливим ризиком на довкілля.

Подяка

Робота виконана за підтримки Національного фонду досліджень України (№ 2020.02/0270) та Міністерства освіти і науки (№ МВ-2).

1. Aebi H. Catalase. In: Methods of Enzymatic Analysis. 1974. P. 673–680.
2. Albuquerque A. F., Ribeiro J. S., Kummrow F., Nogueira A. J., Montagner C. C., Umbuzeiro G. A. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. *Environmental Science: Processes & Impacts.* 2016. Vol. 18, Is. 7. P. 779–787.
3. Bilal M., Iqbal H., Barcelo D. Persistence of pesticides-based contaminants in the environment and their effective degradation using laccase-assisted biocatalytic systems. *Science of The Total Environment.* 2019. Vol. 695, Is. 10: 133896.
4. Bodnar O., Horyn O., Khatib I., Falfushynska H. Multibiomarker assessment in zebrafish *Danio rerio* after the effects of malathion and chlorpyrifos. *Toxicology and Environmental Health Sciences*. 2021. Vol. 13. P. 165–174.
5. Bonomini M., Dottori S., Amoroso L., Arduini A., Sirolli V. Increased platelet phosphatidylserine exposure and caspase activation in chronic uremia. *J. Thromb. Haemost.* 2004. Vol. 2. P. 1275–1281.
6. Casida J. E., Durkin K. A. Chemical research in toxicology: lessons from nature. *Chem. Res. Toxicol.* 2017. Vol. 30, Is. 1. P. 94–104.
7. Cortys-Iza C. S., Rodriguez A. I.1 Oxidative stress and pesticide disease: a challenge for toxicology. *Revista de la Facultad de Medicina.* 2018. Vol. 66, Is. 2. P. 261–267.
8. Dua R., Gill K. D. Effect of aluminium phosphide exposure on kinetic properties of cytochrome oxidase and mitochondrial energy metabolism in rat brain. *Biochim Biophys Acta*. 2004. Vol. 1647, Is. 1. P. 4–11.
9. Fadaei A., Dehghani M. H., Nasseri S., Mahvi A. H., Rastkari N., Shayeghi M. Organophosphorous pesticides in surface water of Iran. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2012. Vol. 88, Is. 6. P. 867–869.
10. Falfushynska H. I., Gnatyshyna L. L., Stoliar O. B. Population-related molecular responses on the effect of pesticides in *Carassius auratus gibelio*. *Comparat. Biochem. Physiol. C. Toxicol Pharmacol.* 2012. Vol. 155, Is. 2. P. 396–406.
11. Glyphosate herbicide found in many midwestern streams, antibiotics not common [Electronic resource] URL: https://toxics. usgs.gov/highlights/glyphosate02.html (дата звернення: жовтень 2021).
12. Goncalves I. F., Souza T. M., Vieira L. R., et al. Toxicity testing of pesticides in zebrafish-a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. *Environ Sci Pollut*. 2020. Vol. 27, Is. 10. P. 10185–10204.
13. Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974. Vol. 249, Is. 22. P. 7130–7139.
14. Henao E., Murphy P. J., Falfushynska H., Horyn O., Evans D. M., Klimaszyk P., Rzymski P. Polymethoxy-1-alkenes screening of *Chlorella* and *Spirulina* food supplements coupled with in vivo toxicity studies. *Toxins*. 2020. Vol. 12, Is. 2. P. 111–123.
15. Kumar S. P., Joshiba J. Pesticides pollution and analysis in water. *Sustainable Agriculture Reviews.* 2020. Vol. 48. P. 337–349.
16. Lanzarin G., Venancio C., Felix M. L., Monteiro S. Inflammatory, oxidative stress, and apoptosis effects in zebrafish larvae after rapid exposure to a commercial glyphosate formulation. *Biomedicines*. 2021. Vol. 9, Is. 12: 1784.

17. Ma J., Zhu J., Wang W., Ruan P., Rajeshkumar S., Li X. Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp. *Environ Pollut.* 2019. Vol. 252 (Pt B). P. 1288–1300.
18. McAvoy T., Nairn A. C. Serine/threonine protein phosphatase assays. *Protoc. Mol. Biol.* 2010. Vol. 18. P. 8–17.
19. Mise S., Sener M., Silici S., Enis M. Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio*: protective role of propolis. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2014. Vol. 102. P. 202–209.
20. Ndonwi E., Atogho-Tiedeu B., Lontchi-Yimagou E. et al. Gestational exposure to pesticides induces oxidative stress and lipid peroxidation in offspring that persist at adult age in an animal model. *Toxicological Research.* 2019. Vol. 35. P. 241–248.
21. Palma-Onetto V., Oliva D., González-Teuber M. Lethal and oxidative stress side effects of organic and synthetic pesticides on the insect scale predator *Rhyzobius lophanthae*. *Entomologia Generalis.* 2021. Vol. 41, Is. 4. P. 345–355.
22. Panetto O. S., Gomes H. F., Fraga Gomes D. S., et al. The effects of Roundup® in embryo development and energy metabolism of the zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2019. Vol. 222. P. 74–81.
23. Perez-Rodriguez V., Wu N., Cova A., Schmidt J., Denslow D., Martyniuk C. The organochlorine pesticide toxaphene reduces non-mitochondrial respiration and induces heat shock protein 70 expression in early-staged zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2020. Vol. 228: 108669.
24. Reddy P. B. Evaluation of malathion induced oxidative stress in *Tilapia mossambica*. *Trends in Fisheries Research.* 2017. Vol. 6, Is. 3. P. 19–25.
25. Samanta P., Pal S., Mukherjee A. K., Ghosh A. R. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2014. Vol. 107. P. 120–125.
26. Slaninova A., Smutna M., Modra H., Svobodova Z. Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinology Letters.* 2009. Vol. 30, Is. 1. P. 2–12.
27. Tresnakova N., Stara A., Velisek J. Effects of glyphosate and its metabolite AMPA on aquatic organisms. *Applied Sciences.* 2021. Vol. 11, Is. 19. 9004.
28. Uren Webster T. M., Laing L. V., Florance H., Santos E. M. Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol.* 2014. Vol. 48, Is. 2. P. 1271–1279.
29. Velasques R. R., Sandrini J. Z., da Rosa C.E. Roundup(®) in Zebrafish: effects on oxidative status and gene expression. *Zebrafish*. 2016. Vol. 13, Is. 5. P. 432–441.

O. I. Bodnar, I. Khatib, O. I. Goryn, O. V. Soroka, Kh. I. Nimko, I. V. Chernik, G. B Kovalska, H. I. Falfushynska

Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University, Ukraine

OXIDATIVE STRESS AND METABOLIC DISORDERS IN *DANIO RERIO* FOR THE ACTION OF PHOSPHOORGANIC PESTICIDES

The aim of this study was to analyze the effects of roundup and malathion in environmentally relevant and subtoxic concentrations on the metabolic processes of zebrafish *Danio rerio*. Pesticide toxicity was assessed by changes in the activity of enzymes catalase, succinate dehydrogenase, glutathione transferase, glutathione reductase, protein phosphatase and caspase 3.

Roundup has been shown to activate catalase, protein phosphatase, and caspase-3, whereas malathion induces caspase 3 only. At the same time, the studied organophosphate pesticides caused a significant decrease in glutathione transferase and succinate dehydrogenase compared to the control, especially under the action of malathion. Moreover, under the influence of malathion there was a decrease in the activity of protein phosphatase and catalase. As for glutathione reductase, the subtoxic concentration of roundup caused its activation, and the ecologically real concentration of malathion caused its inhibition. In sum, malathion caused more noticeable toxic effects in zebrafish than roundup.

Therefore, organophosphate pesticides carry significant risks of toxic effects on fish as non-target organisms, which is important to consider when choosing agronomic maintenance options for the harvest and the potential danger to the environment.

Keywords: phosphoorganic pesticides, toxicity, enzymes, zebrafish.

Надійшла 12.10.2021.