

ISSN 1563-034X
Индекс 75880; 25880

ӘЛ-ФАРАБИ атындағы ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ

ҚазҰУ ХАБАРШЫСЫ

Экология сериясы

КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени АЛЬ-ФАРАБИ

ВЕСТНИК КазНУ

Серия экологическая

AL-FARABI KAZAKH NATIONAL UNIVERSITY

KazNU BULLETIN

Ecology series

№3 (45)

Алматы
«Қазақ университеті»
2015

Жапарқұлова Н.И.,
Мырзахметова М.Қ.,
Аралбаева А.Н.,
Маматаева А.Т.,
Өтеғалиева Р.С.

Клетка мембраналарының күйіне гербицид әсерін зерттеу

Zhaparkulova N.I.,
Myrzahmetova M.K.,
Aralbaeva A.N.,
Mamataeva A.T.,
Otegalieva R.S.

Study of influence of herbicides on cell membranes

Жапарқұлова Н.И.,
Мырзахметова М.Қ.,
Аралбаева А.Н.,
Маматаева А.Т.,
Өтеғалиева Р.С.

Исследование влияния гербицида на мембраны клеток

Биосфераға антропогенді әсердің ауыртпашылығы жаһандық экологиялық мәселе болып табылады. Қоршаған ортаның қолайсыз өзгерістерін туғызатын химиялық факторлардың бірі пестицидтер болып табылады. Ауылшаруашылық мәселелерді шешу мақсатында енгізілетін пестицидтер қоршаған ортада жинақталып, трофикалық тізбектермен берілу арқылы адам денсаулығына кесірін тигізбей қоймайтыны мәлім. Пестицидтердің туғызатын эффектілерінің алуан түрлілігіне қарамастан тірі организмдерге әсер етуінің молекулалық механизмдері көп зерттелмеген. Заманауи ғылым көзқарасы бойынша ксенобиотиктардың тірі ағзаға улы әсерінің негізінде түрлі тканьдерде липидтердің асқын тотығуына алып келетін бос радикалдардың түзілуі жатады. Гербицидтер – пестицидтерге жататын аз зерттелген қосылыстар тобы. Мақалада «Аргумент» гербицидінің ми, бауыр, бүйрек және қандағы липидтердің тотығуына әсерін *in vitro* жағдайында зерттеу нәтижелері берілген. Жасалған жұмыс барысында гербицид барлық зерттелген нысандарда липопероксидация процесін жоғарылатып, эритроциттердің осмотық резистенттілігін төмендететіндігі және де оның әсері дозаға тәуелді түрде болатыны анықталды.

Түйін сөздер: гербицид, мембрана, липидтердің асқын тотығу процесі, эритроциттер, қан сарысуы.

The anthropogenic impact on the biosphere is a global environmental problem. One of the major man-made chemical factors that cause adverse changes in the environment, pesticides are to be introduced into the environment for solving agricultural problems and are able to circulate and accumulate in it. Passing through the food chain, they get into the body and may pose a threat to his health. Common molecular mechanisms of action of pesticides on living organisms are not well understood, although it is known that a large number of effects caused by them. In connection with modern ideas at the heart of the toxic effect of xenobiotics on the body is the process of intensification of free radicals causing oxidative stress. Herbicides, it is one of the little-known compounds related to pesticides. The work was to study the effect of systemic herbicide «Argument» on the state of cell membranes vital organs. It was revealed that the *in vitro* one of the types of pesticides – herbicide «Argument» dose-dependently increases the intensity of lipid peroxidation in the membranes of the brain, liver, kidneys, and increases red blood cell hemolysis level, indicating an adverse change in the properties of the membranes of blood cells. The results of studies that have shown that under *in vitro* conditions pesticide dose-dependently increases the intensity of lipid peroxidation in the membranes of the brain, liver, kidneys, red blood cells and lipid components of blood serum.

Key words: herbicide membrane lipid peroxidation, erythrocytes, serum.

Антропогенное воздействие на биосферу является глобальной экологической проблемой. Одним из важных антропогенных химических факторов, вызывающих неблагоприятные изменения окружающей природной среды, являются пестициды, которые вносятся в окружающую среду для решения сельскохозяйственных задач и способны циркулировать и накапливаться в ней. Передаваясь по трофическим цепям, они попадают в организм человека и могут создавать угрозу его здоровью. Общие молекулярные механизмы действия пестицидов на живые организмы изучены недостаточно, несмотря на то, что известно большое количество вызываемых ими эффектов. В связи с современными представлениями в основе токсического действия ксенобиотиков на организм лежит процесс интенсификации образования свободных радикалов, вызывающих окислительный стресс. Гербициды – являются одним из малоизученных соединений, относящихся к пестицидам. В работе было исследовано влияние системного гербицида «Аргумент» на состояние мембран клеток жизненно важных органов. Выявлено, что в условиях *in vitro* один из видов пестицидов – гербицид Аргумент дозозависимо повышает интенсивность процессов перекисного окисления липидов в мембранах мозга, печени, почек, эритроцитов и повышает уровень гемолиза, что свидетельствует о негативном изменении свойств мембран клеток крови.

Ключевые слова: пестицид, мембрана, перекисное окисление липидов, эритроциты, сыворотка.

КЛЕТКА МЕМБРАНАЛАРЫНЫҢ КҮЙІНЕ ГЕРБИЦИД ӘСЕРІН ЗЕРТТЕУ

Кіріспе

Пестицидтерді пайдалану – қазіргі кезде зиянкестермен, өсімдік ауруларымен, арамшөптермен күресуде тиімді болып табылатын өсімдіктерді қорғаудың химиялық әдісінің негізі [1, 2]. Пестицидтерді енгізу ауыл және орман шаруашылығында, ағаш өңдеу өнеркәсібінде шығындарды азайтуға көмектеседі. Оларды пайдалануға кеткен шығындар 5-12 есе өтеледі. Дегенмен, пестицидтерді (гербицид, инсектицид, дефолианттар) шектен тыс қолдану қоршаған ортаға зиянын тигізбей қоймайды [3-6]. Соған орай, пестицидтерді пайдалану проблемасы мен олардың табиғи экожүйелерге және адам денсаулығына әсерінің салдарларын зерттеу мәселесінің өзектілігі артып отыр [7-9]. Күнделікті өмірде кеңінен қолданылатын пестицидтер тобына гербицидтер жатады. Гербицидтер – қажетті алаптарды арамшөптерден арылту мақсатында қолданылатын химиялық қосылыстар. Гербицидтер аса улы заттарға жатады, сондықтан да олардың адам ағзасына әсер ету ықтималдығын барынша төмендету маңызды мәселе. Көптеген гербицидті әсері бар химикаттар қатерлі ісік, аллергия және Паркинсон ауруы сияқты кеселдердің себебі ретінде қарастырылады. Дегенмен, басқа пестицидті қосылыстарға қаағанда гербицидтердің адам ағзасына және қоршаған ортаға әсері аз зерттелген [10-11]. Біздің зерттеу жұмыстарымыздың мақсаты арамшөптерге жүйелі әсер ететін «Ирбис» гербицидінің органдар және эритроциттер мембраналарының күйіне, сонымен қоса қан сарысуындағы ЛАТ процестеріне әсері *in vitro* жағдайында зерттеу.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Қойылған мақсаттар мен міндеттеріне байланысты тәжірибелер *in vitro* жағдайында салмағы 300-350 г 10 ересек егеуқұйрықтардың қан сарысуы, эритроциттері бауыр, бүйрек және ми микросомаларының препараттарымен жасалды. *In vitro* жағдайындағы тәжірибелерде гербицидтің түрлі концентрацияларындағы ерітінділері пайдаланылды.

Эритроциттер мен қан сарысуын бөліп алу. Егеуқұйрықтардың қаны ұйып қалмауы үшін гепарин ерітіндісі қолданыл-

ды. Қанды 1000g жылдамдықпен центрифугада 10 мин айналдыру арқылы эритроциттер мен қан сарысуы бөлініп алынды. Қан сарысуынан ажыратылған эритроциттер құрамында 150мМ NaCl, 5мМ Na_2HPO_4 (рН-7,4) бар инкубация ортасы (ИО) буферлі ерітіндімен екі қайтара шайылды. Алынған қанның қызыл түйіршіктері тәжірибе жұмыстарында пайдаланылды.

Тәжірибе жасалмас бұрын алдын ала эритроциттер 20 есе буферлі ерітіндімен сұйылтылып, 37°C температурада 5 мин термостатта қыздырылды.

Органдар микросомаларының фракцияларын бөліп алу. Егеуқұйрық бауыр, бүйрек және ми ұлпасы (5,0-10 г) құрамында 0,85% NaCl және 50 мМ KH_2PO_4 (4°C, рН 7,4) ерітіндіде жуылғаннан соң (1:10) Polytron гомогенизаторымен 90 сек үш рет ұсақталынып, гомогенат 20 мин бойы 10 000g жылдамдықта центрифугада айналдырылғаннан кейінгі супернатантты 60 мин бойы 30 000g жылдамдықта центрифугада айналдыру арқылы микросомды фракциялар алынды. Тұнба бетіндегі сұйықтық құйып алынып, түбінде қалған ауыр микросомды фракция құрамында 25% глицерин, 0.1 мМ ЭДТА, 0.2 мМ CaCl_2 , 10 мМ гистидин бар ортада (4°C, рН 7.2) суспензияланып, минус 4°C температурада сақталды.

Липидтердің асқын тотығуын анықтау. Органдар мембраналарының микросомаларындағы және эритроциттер мен қан сарысуындағы липидтердің асқын тотығу қарқындылығы (ЛАТ) тиобарбитур қышқылы (ТБК) белсенді өнімдерінің мөлшерімен бағаланды. Малон диальдегидінің (МДА) концентрациясы Н.О. Ohkawa e.a. [12, 13] әдісі бойынша тиобарбитур қышқылымен әрекеттесу нәтижесінде пайда болған бояудың түсіне байланысты анықталды. Мембранадағы ЛАТ Fe^{2+} (0,02 мМ)+аскорбат (0,5 мМ) жүйесімен 60 мин бойы 37°C индукцияланды. Сынамалардың оптикалық тығыздығы PD-303 UV спектрофотометрінің көмегімен 432 нм толқын ұзындығында өлшенді. ТБК-мен әрекеттесетін өнімдердің мөлшері $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ мәніне тең болатын МДА молярлы экстинкция коэффициентін ескере отырып есептелді.

Эритроциттердің осмостық резистенттілігін анықтау үшін эритроциттер суспензиясын 37°C температурада натрий хлоридінің 0,8 мг/мл ерітінділерінде 20 инкубацияланды. Эритроциттер центрифугалау әдісімен тұндырылып, супернатанттағы гемоглобин концентрациясы 540 нм толқын ұзындығында оптикалық тығыздығын өлшеу арқылы анықталды. Клеткалар

гемолизінің дәрежесін 0,1г/100 мл концентрациядағы Na_2CO_3 ерітіндісіндегі 100% гемолиз деңгейіне қатысты проценттік қатынаста есептелінді.

Алынған нәтижелердің арифметикалық ортақ көрсеткіші, ортақ квадраттық ауытқуы, ортақ арифметикалық қатесі есептелініп, Microsoft Excel бағдарламасымен өңделді. Фишер-Стьюденттің критерийі ескерілді, параметрлер сенімділігі $p \leq 0.05$.

Зерттеу нәтижелерін талқылау

Алға қойылған мақсатқа қол жеткізу үшін *in vitro* жағдайында бірнеше тәжірибелер жасалды. Организмдегі барлық физиологиялық процестердің жүзеге асуын қамтамасыз ететін биологиялық мембрана маңызды болып табылады. Оның зақымдалуы клетка қызметінің істен шығып, жалпы ағзаның деңгейінде түрлі патология ретінде көрінеді. Клетка мембранасының зақымдалуының әмбебап механизмі, құрамындағы липид молекулаларының асқын тотығу процесі болып табылатыны белгілі. Гербицидтің өмірлік маңызды органдар, қан сарысуы және эритроциттердегі асқын тотығу процесстерінің қарқындылығына әсерін зерттеу мақсатында оның әртүрлі концентрациялары алынды.

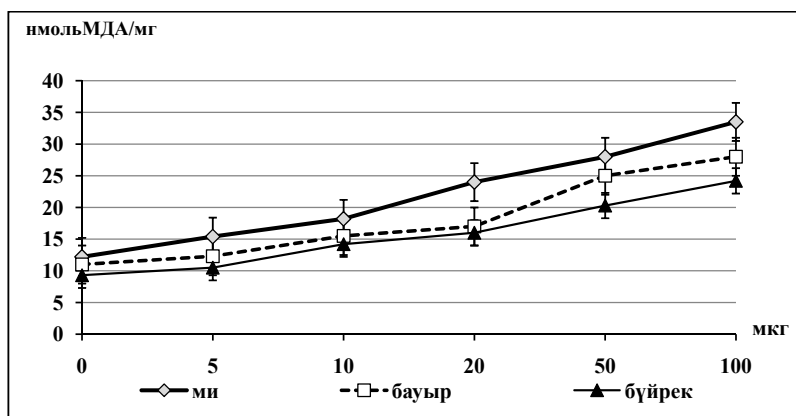
1-суретте гербицидтің түрлі концентрацияларының ми және бауыр микросомаларына әсері бейнеленген.

Суретте көрініп тұрғандай, токсикант концентрациясы жоғарылаған сайын липидтердің асқын тотығу қарқындылығы да біртіндеп арта түседі. Ми тканьдеріндегі липопероксидация дәрежесі 10 мкг концентрациядағы гербицид ерітіндісінің әсерінен бірден 49% жоғарылаған Гербицидтің бауыр және бүйрек микросомаларындағы липопероксидация процестерінің қарқындылығына әсерін зерттеу ұқсас тенденция көрсетті. Алайда суреттен гербицидтің елеулі әсері 10 мкг концентрацияда болатындығы аңғарылды. Концентрациясы 5 мкг гербицид ерітіндісі асқын тотықтық процестерді айтарлықтай дәрежеде күшейтетін әсері байқалмады. Зерттеу нәтижелері көрсеткендей, гербицид ерітіндісінің 5-20 мкг тең концентрациялары гепатоциттердегі және бүйрек микросомаларындағы ЛАТ қарқындылығын біртіндеп арттырса, 50 мкг концентрацияларында ТБК-белсенді өнімдер мөлшерін 2 есе, 100 мкг мөлшерде 2,5 есе күрт жоғарылатты. Сонымен суретте көрініп отырғандай ми ткані гербицид әсеріне бауыр мен бүйрек клеткаларына қарағанда сезімтал, оның себебі, ми

клеткаларының құрамындағы мембраналардың фосфолипидтік қос қабат молекулаларының ерекшеліктеріне байланысты.

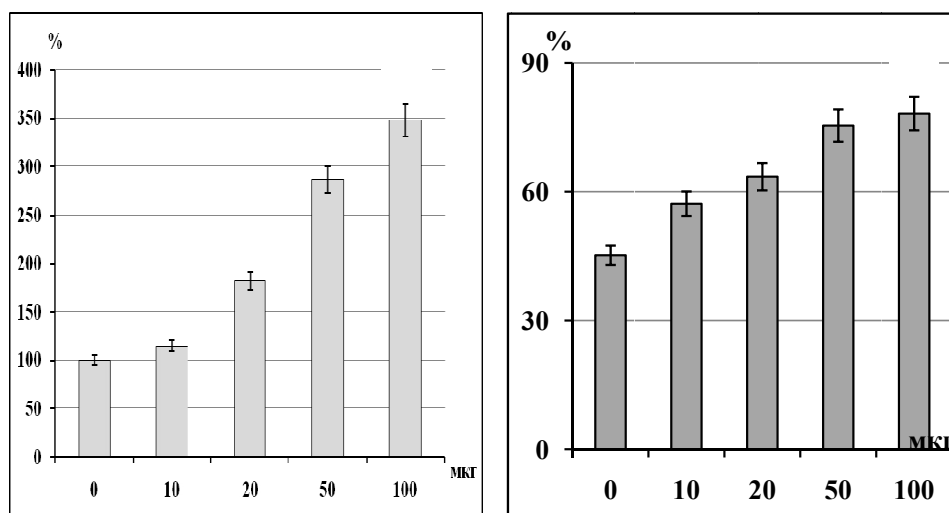
Тәжірибелердің келесі сериясы гербицид ерітіндісінің түрлі концентрацияларының эритроциттердің осмотық резистенттілігі мен олардағы МДА жинақталу процесіне әсерін анықтауға арналды (2-сурет). Алынған зерттеу нәтижелері бойынша эритроцит мембраналарындағы

асқын тотығу процестерінің қарқындылығы гербицид ерітіндісінің 10-100 мкг аралығындағы концентрацияларының әсерінен бастапқы деңгейінен 3,5 есе жоғарылады (2А-сурет). Алайда суреттен көрініп тұрғандай, гербицидтің әсер етуші концентрациясы 10 мкг болғанда эритроциттер мембраналарындағы липопероксидация дәрежесі 15% артса, одан жоғары мөлшерде бірден 1,8-3 есе көтерілді.



Абсцисс өсі: гербицид концентрациясы, мкг; ординат өсі: ЛАТ деңгейі, % ($p \leq 0,001$).

1-сурет – Гербицидтің әртүрлі концентрацияларының органдар микросомаларына әсері



Абсцисс өсі: гербицид концентрациясы, мкг; ординат өсі: А-ЛАТ деңгейі, Б-гемолиз дәрежесі, % ($p \leq 0,001$).

2-сурет – Гербицидтің әртүрлі концентрацияларының эритроциттердегі (А) липидтердің асқын тотығу процестеріне және осмотық резистенттілігіне (В) әсері

Гербицид ерітінділерінің әсерінен эритроцит мембранасының гипотониялық ерітінділерге төзімділігінің өзгеруі 2В-суретте бейнеленген.

Бұл жағдайда да бұл көрсеткіштің гербицидтің дозасына тәуелді өзгертіндігі көрінді. 0,8% натрий хлоридінің ерітіндісінде эритроциттердің

гемоллизге ұшырау дәрежесі 45,2% құраса, инкубациялық ортаға гербицид ерітіндісін қосу гемоллизге ұшыраған клеткалар санын 10 мкг концентрацияда 1,3 есе, 20 мкг – 1,4 есе, 50 мкг аса концентрацияда 1,7 есе артқан.

Қорытынды

Зерттеу жұмыстарының нәтижелері талдай келе, гербицидтің мембраналар құрамындағы липидтердің тотығу процестерін жоғарылатын әсері байқалатындығы және де ол әсердің *in vitro* жағдайында мөлшеріне тәуелді болатыны

анықталды. Зерттеуге алынған органдар микросомаларындағы ТБК-белсенді өнімдердің мөлшерін сараптай келгенде, ми тканьдерінің бауыр және бүйрекке қарағанда гербицид әсеріне төзімділігі төмен екендігі белгілі болды. Оның себебін біз ми клеткаларының мембраналарының құрамында липидті компоненттердің басым болуымен байланыстыруға болады. Сонымен бірге алынған нәтижелерге сәйкес, липидтер пероксидациясына негізделген мембрана қасиеттерінің және құрылымының бұзылуы эритроциттер осмотық резистенттілігінің төмендеуінің механизмін түсіндіреді.

Әдебиеттер

- 1 Мельников Н.Н., Мельникова Г.М. Пестициды в современном мире // Соросовский образовательный журнал – 1997. – №4. – С. 33-37.
- 2 Неменко Б.А., Спатаев М.Б., Криницына Л.А., Мукашева Л.Б., Кошкимбаева К.С. (Байгонова К.С.), Лян Л.Б., Жуматаева Г.Н. Санитарные правила и нормы по применению химических средств защиты растений // Сборник санитарных правил и норм, методических указаний по токсикологии пестицидов. – Алматы, 2000. – 128 с.
- 3 Jang Y., Kim J.E., Jeong S.H., Cho M.H. Towards a strategic approaches in alternative tests for pesticide safety // Toxicol Res.- 2014. – Vol. 3. – № 30. – P. 159-68.
- 4 Katagi T. Surfactant effects on environmental behavior of pesticides // Rev Environ Contam Toxicol. – 2008. – № 194. – P. 71-177.
- 5 Katagi T. Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms // Rev. Environ. Contam. Toxicol. – 2010. – № 204. – P. 1-132.
- 6 Damalas C.A., Eleftherohorinos I.G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2011. – Vol 5. – № 8. – P. 1402-19.
- 7 Beyer A., Biziuk M. Environmental fate and global distribution of polychlorinated biphenyls // Rev Environ Contam Toxicol. – 2009. – № 201. – P. 137-58.
- 8 Сапарбеков М.К., Байгонова К.С., Аширбеков Г.К., Тянь А.Д. Принципы экологической эпидемиологии применительно к оценке риска при воздействии пестицидов на здоровье человека // Гигиена, эпидемиология және иммунобиология – 2008. – Том 36. – №2. – С. 91-94.
- 9 Belfroid AC(1), van Druenen M, Beek MA, Schrap SM, van Gestel CA, van Hattum B. Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems // Sci. Total. Environ. – 1998. – Vol.3. – № 222. – P.167-83.
- 10 Williams G.M., Kroes R., Munro I.C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans// Regul Toxicol Pharmacol.- 2000. – №31. – P.117-65.
- 11 Bradberry SM¹, Proudfoot AT, Vale JA. Glyphosate poisoning // Toxicol Rev. 2004. – Vol.3. – № 23. – P. 159-67.
- 12 Ohkawa H.O., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction //Anal.Biochem. – 1979. – Vol. 95. – N 2. – P.351-358.
- 13 Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.

References

- 1 Mel'nikov N.N., Mel'nikova G.M. Pesticidy v sovremennom mire // Sorosovskij obrazovatel'nyj zhurnal – 1997. – №4.- S.33-37.
- 2 Nemenko B.A., Spataev M.B., Krinicyna L.A., Mukasheva L.B., Koshkimbaeva K.S. (Bajgonova K.S.), Ljan L.B., Zhumataeva G.N. Sanitarnye pravila i normy po primene-niju himicheskikh sredstv zashhity rastenij // Sbornik sanitarnyh pravil i norm, meto-dicheskikh ukazanij po toksikologii pesticidov. – Almaty, 2000. – 128 s.
- 3 Jang Y., Kim J.E., Jeong S.H., Cho M.H. Towards a strategic approaches in alternative tests for pesticide safety // Toxicol Res.- 2014. – Vol. 3. – № 30. – R. 159-68.
- 4 Katagi T. Surfactant effects on environmental behavior of pesticides // Rev Environ Contam Toxicol. – 2008. – № 194. – R. 71-177.
- 5 Katagi T. Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms // Rev. Environ. Contam. Toxicol. – 2010. – № 204. – R. 1-132.

- 6 Damalas C.A., Eleftherohorinos I.G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2011. – Vol 5. – № 8. – R. 1402-19.
- 7 Beyer A., Biziuk M. Environmental fate and global distribution of polychlorinated biphenyls // *Rev Environ Contam Toxicol*. – 2009. – № 201. – R. 137-58.
- 8 Saparbekov M.K., Bajgonova K.S., Ashirbekov G.K., Tjan A.D. Principy jekologichesk-koj jepidemiologii primenitel'no k ocenke riska pri vozdeystvii pesticidov na zdo-rov'e cheloveka // *Gigiena, jepidemiologija zhəne immunobiologija* – 2008. – Tom 36. – №2. – S. 91-94.
- 9 Belfroid AC(1), van Drunen M, Beek MA, Schrap SM, van Gestel CA, van Hattum B. Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems // *Sci. Total. Environ*. – 1998. – Vol.3. – № 222. – R.167-83.
- 10 Williams G.M., Kroes R., Munro I.C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans// *Regul Toxicol Pharmacol*.- 2000. – №31. – R.117-65.
- 11 Bradberry SM1, Proudfoot AT, Vale JA. Glyphosate poisoning // *Toxicol Rev*. 2004. – Vol.3. – № 23. – R. 159-67.
- 12 Ohkawa H.O., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal.Biochem*. – 1979. – Vol. 95. – N 2. – P.351-358.
- 13 Vladimirov Ju.A., Archakov A.I. Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskikh membranah. – M.: Nauka, 1972. – 252 s.