

THE BALANCE OF GLUTAMATE DEHYDROGENASE REACTION UNDER THE INFLUENCE OF MANGANESE, ZINC AND COPPER IONS IN CARP TISSUES

As a result of the carried out researches it was determined, that the ions of manganese, zinc and copper displaced the balance in glutamate dehydrogenase system. In muscles the synthesis of glutamate prevailed and in liver — the destruction of the one. It is rather difficult to explain some changes in the enzyme activity, but the displacement of the balance of glutamate dehydrogenase system is the adaptation of carp to stress, which was caused by the influence of heavy metals ions.

Надійшла 27.12.2000

УДК 577.352.38: 577.64

О.Б. Столяр

Тернопільський державний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка
46027 Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2

ОКИСНЮВАЛЬНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ ГЕПАТОПАНКРЕАСУ І ПЛАЗМИ КРОВІ КОРОПА ЗА ІНТОКСИКАЦІЇ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ

короп важкі метали гепатопанкреас плазма крові окиснювальна модифікація білків

У процесах біологічного окиснення молекули кисню можуть утворювати нестабільні частково відновлені продукти — пероксид-аніон, супероксид-аніон, гідроксид-радикал та інші, які загалом називають активними формами кисню (АФК) у зв'язку з їх високою реакційною здатністю [9]. АФК уражають біомолекули, викликаючи їх хімічні модифікації, і генерують утворення вторинних реактивних частинок (радикалів, пероксидів, ненасичених сполук, альдегідів), які також можуть впливати на структуру біомолекул. Йони важких металів, які мають змінну валентність, вважаються активаторами в процесах генерації АФК та окисної деструкції біомолекул. Зокрема така дія продемонстрована для іонів заліза [3].

Організми гідробіонтів у зв'язку з особливостями респіраторного режиму становлять теоретичний і практичний інтерес в дослідженні їх відповіді на окисдаційний стрес та його модуляцію такими поширеними забруднювачами водойм як важкі метали. Показано, що свинець, манган, мідь і цинк при дії в концентрації, яка відповідає 2 ГДК, викликають зміни вмісту первинних і вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та активності ферментів антиоксидантного захисту в тканинах коропа [2, 6, 10, 11, 14].

Останнім часом більше уваги стало привертати вивчення окиснювальної деструкції білків та встановлення його ролі в оксидативному стресі. Відомо, що важкі метали викликають порушення активності ферментів білкового обміну [4], проникності клітинних мембран [6]. Це, ймовірно, може бути спричинено змінами в будові білків під безпосереднім впливом металів або внаслідок ініційованого ними накопичення АФК, продуктів окиснення жирних кислот тощо. Можливості безпосереднього вивчення цих змін в білках зросли у зв'язку з впровадженням в дослідження методу визначення окиснених похідних аліфатичних амінокислотних радикалів в білках за їх здатністю утворювати забарвлені 2,4-динітрофенілгідрозони [3, 7].

Становить інтерес виявлення залежності між природою металу, загальним ступенем ураження організму (доза відносно ГДК) та ступенем окисненого ураження білків. Тому метою нашої роботи стало дослідження вмісту окиснених похідних білків в гепатопанкреасі і плазмі крові коропа при дії на організм йонів свинцю, мангану, цинку і міді в концентраціях, які відповідають 0,1, 2 і 5 ГДК.

Матеріали і методи досліджень

Дослідження проводились на короні лускатому (*Cyprinus carpio* L.) масою 200 — 250 г, попередньо адаптованому до умов акваріуму. Риб, групами по 6 тварин, утримували протягом 14 днів у басейнах об'ємом 200 л при температурі близько 18°C у відстояній, добре аерованій воді. Воду в басейнах змінювали щодобово, підтримуючи в ній необхідний вміст металу. Вміст свинцю (II) у вигляді нітрату у воді становив 0,01, 0,2 і 0,5 мг/л, мангану (II) у вигляді хлориду — 0,13, 2,6 і 6,5 мг/л, цинку (II) у вигляді сульфату — 0,1, 2,0 і 5,0 мг/л, міді (II) у вигляді сульфату — 0,01, 0,2 і 0,5 мг/л. Створені концентрації металів відповідають 0,1 2 і 5 ГДК [1].

Для аналізу використовували гепатопанкреас та кров з серця риби, яку відбирали з гепарином. Всі процедури по виділенню і обробці зразків проводились на холоді. Окиснювальну модифікацію білків плазми крові і гепатопанкреасу визначали за їх здатністю утворювати 2,4-динітрофенілгідразони [7]. Вміст фенілгідразонів обчислювали за формулами:

$A_{370,430} = E_{370(430)} \cdot d \cdot 1000 / C_{\text{білка}}$ (о.о.г./г білка). $C_{370} = A_{370} / 21$ (мМ/г білка), де А — вміст фенілгідразонів в умовних одиницях, С — їх концентрація в мМ/г білка, Е — екстинція проби, d — розведення тканини (d для печінки — 100, для плазми — 10), о.о.г. — одиниці оптичної густини. 21 мМ⁻¹ см⁻¹ — мільмолярний коефіцієнт екстинції фенілгідразонів при 370 нм

Вміст білків в тканинах визначали за методом Лоурі і співр [13]. Білки гепатопанкреасу попередньо виділяли [15]. Результати обробляли статистично [8].

Результати досліджень та їх обговорення

У результаті окиснення білків можуть утворюватись як альдегідні, так і кетонні похідні амінокислотних залишків [3, 7]. Обидва типи похідних взаємодіють з 2,4-ДФГ. Аліфатичні кетон-динітрофенілгідразони нейтрального характеру поглинають з максимумом при 363-367 нм, а основного характеру — 430-434 нм і 524-535 нм. У тварин контрольної групи нами були виявлені продукти окиснення білків як в гепатопанкреасі, так і в плазмі крові, причому, в розрахунку на білок, їх кількість в гепатопанкреасі була вищою, ніж в плазмі крові (табл. 1 — 3). Кількість похідних нейтрального характеру, рівень яких реєстрували при 370 нм, була вищою, ніж похідних основного характеру, які вимірювали при 430 нм. Найбільш помітна відмінність в кількості цих похідних спостерігалась для білків плазми крові

Таблиця 1

Дія іонів важких металів в концентрації, що відповідає 0,1 ГДК, на вміст 2,4-динітрофенілгідразонів в гепатопанкреасі і плазмі крові коропа, M±m, n= 5

Дослідна група	Рівень фенілгідразонів		
	Одиниці оптичної густини · 1 г білка, довжина хвилі 370 нм	мМ / 1 г білка, довжина хвилі 370 нм	Одиниці оптичної густини · 1 г білка довжина хвилі 430 нм
Гепатопанкреас			
Контроль	48,8±2,3	1,96±0,33	39,6±3,6
Свинець	19,4±3,5*	1,24±0,31*	12,7±2,8*
Манган	11,0±1,5*	0,52±0,07*	6,75±1,8*
Цинк	37,8±2,1*	1,80±0,10	30,8±2,2
Плазма крові			
Контроль	52,2±1,2	1,53±0,06	14,3±1,0
Свинець	39,7±3,7	1,89±0,18	23,6±5,4
Манган	13,5±2,8*	0,64±0,13*	4,63±1,33*
Цинк	40,2±12,5	5,52±1,73	56,8±12,6

Примітка до табл. 1-3. * — відхилення від контролю провідні р<0,05

Дослідження дії свинцю, мангану та цинку в концентраціях, які становлять 0,1 ГДК, показало (табл. 1), що в гепатопанкреасі коропа всі ці метали зменшують інтенсивність окиснення білків, причому пригнічують утворення динітрофенілгідразонів як нейтрального, так і основного характеру. В крові коропа зменшення вмісту окиснених продуктів білків при дії

такої концентрації викликає лише манган, а цинк проявляє тенденцію збільшувати ці показники

При дії в концентрації, що відповідають 2 ГДК (табл. 2), свинець, цинк і мідь викликають істотне збільшення кількості окиснених продуктів, як нейтрального, так і основного характеру в гепатопанкреасі коропа. Їх кількість зростає в два — три рази. При дії мангану ці показники залишаються в межах норми. У плазмі крові помітне збільшення вмісту окиснених продуктів білків викликають цинк і мідь (в два рази), тоді як при дії свинцю і мангану ці показники залишаються в межах норми.

Концентрація 5 ГДК (табл. 3) виявилась детальною при дії міді і дала значну розбіжність результатів визначення параметрів гепатопанкреасу при дії свинцю. Серед інших металів, на відміну від дії менших їх доз, токсичний вплив на гепатопанкреас спричинює манган, тоді як цинк не викликає прогідних змін показників в цій тканині. У крові спостерігаються значні відмінності між впливом металів на утворення похідних нейтрального і основного характеру, що також не відзначалось при дії менших доз металів. Свинець і цинк викликають найзначніше зростання похідних нейтрального характеру, тоді як манган не змінює цей показник порівняно з контролем. Похідні основного характеру утворюються при дії свинцю і цинку в тій же кількості, що і в контролі, а при дії мангану — значно менше.

Таблиця 2

Дія йонів важких металів в концентрації, що відповідає 2 ГДК, на вміст 2,4-динітрофенілгідразонів в гепатопанкреасі і плазмі крові коропа, $M \pm m$, n = 5

Дослідна група	Рівень фенілгідразонів		
	Одиниці оптичної густини / 1 блітка, довжина хвилі 370 нм	мМ / 1 г блітка, довжина хвилі 370 нм	Одиниці оптичної густини / 1 блітка, довжина хвилі 430 нм
Гепатопанкреас			
Контроль	54,0±8,5	2,57±0,40	39,2±7,3
Свинець	120,3±6,4*	5,33±0,49*	77,4±6,7*
Манган	80,6±10,9	3,84±0,52	50,2±8,1
Цинк	181,8±2,0*	8,66±0,12*	104,8±2,3*
Мідь	131,6±15,6*	6,27±0,74*	72,9±3,8*
Плазма крові			
Контроль	27,1±1,1	1,29±0,05	16,3±1,3
Свинець	30,6±2,5	1,46±0,12	18,9±2,7
Манган	24,4±1,8	1,16±0,09	14,0±1,1
Цинк	89,7±8,5*	4,27±0,40*	45,7±4,5*
Мідь	80,3±11,2*	3,82±0,53*	40,1±5,5*

Таблиця 3

Дія йонів важких металів в концентрації, що відповідає 5 ГДК, на вміст 2,4-динітрофенілгідразонів в гепатопанкреасі і плазмі крові коропа, $M \pm m$, n = 5

Дослідна група	Рівень фенілгідразонів		
	Одиниці оптичної густини / 1 г блітка, довжина хвилі 370 нм	мМ / 1 г блітка, довжина хвилі 370 нм	Одиниці оптичної густини / 1 г блітка, довжина хвилі 430 нм
Гепатопанкреас			
Контроль	76,9±6,1	3,66±0,29	50,1±5,7
Манган	219,2±23,6*	10,4±1,1*	112,2±24,7*
Цинк	115,1±28,1	5,52±1,36	40,5±14,0
Плазма крові			
Контроль	31,8±1,9	1,53±0,16	39,4±3,7
Свинець	144,5±19,6*	6,88±0,94*	58,8±7,2
Манган	34,9±3,7	1,66±0,17	14,0±1,3*
Цинк	115,8±12,8*	5,51±0,61*	43,8±4,3

Порівняння дії трьох концентрацій металів показує (рис. 1, 2), що для найменшої з них протягом 14 днів викликає у риб адаптивну реакцію, яка особливо проявляється у зменшенні рівня окисненості білків в гепатопанкреасі. При дії в концентрації 2 ГДК жоден з металів не проявляє антиоксидантного впливу на білки організму коропа. Причому, для більшості металів більш помітні зміни порівняно з контролем мають місце в гепатопанкреасі. Отже, стан окиснювальної модифікації білків гепатопанкреасу, порівняно з плазмою крові, є більш інформативним показником антиоксидантно-прооксидантного статусу організму коропа.

Концентрація 5 ГДК є екстремальною і викликає, очевидно, різноманітні порушення структури і функцій біомолекул та їх біосинтезу в організмі. Такий багатofакторний вплив може призвести до порушення закономірностей, виявлених при дії менших концентрацій металів на білки коропа (див. рис. 1, 2).

Кожний з металів в концентраціях 0,1 і 2 ГДК, проявляє специфічну дію. Найбільше антиоксидантні властивості виражені у мангану і найзначніші оксидантні — у цинку. У більшості експериментальних умов, які досліджувались, негативний вплив металів на окиснення білків зростає в ряді: $Mn \rightarrow Pb \rightarrow Cu \approx Zn$.

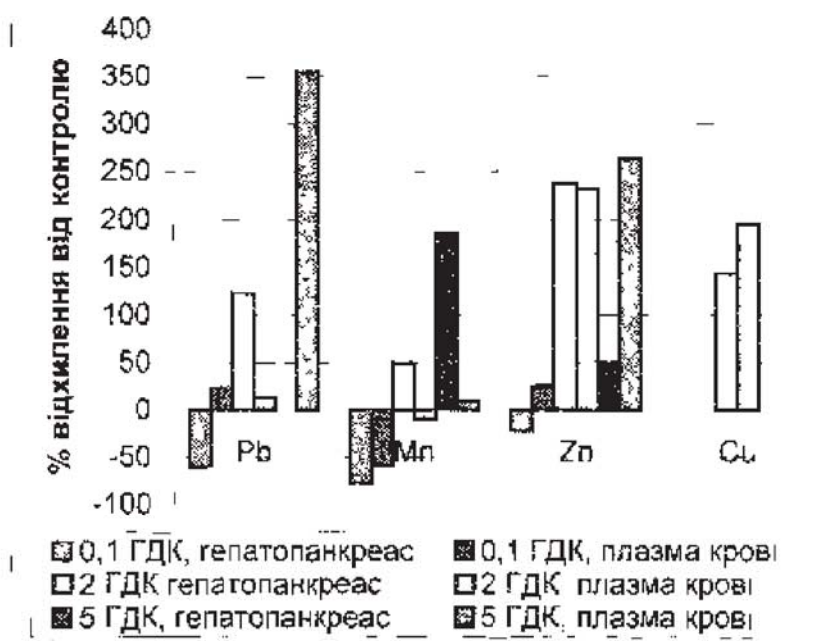


Рис. 1. Вплив іонів важких металів на окиснювальну модифікацію білків в організмі коропа (одиниці оптичної густини при 370 нм / г білка).

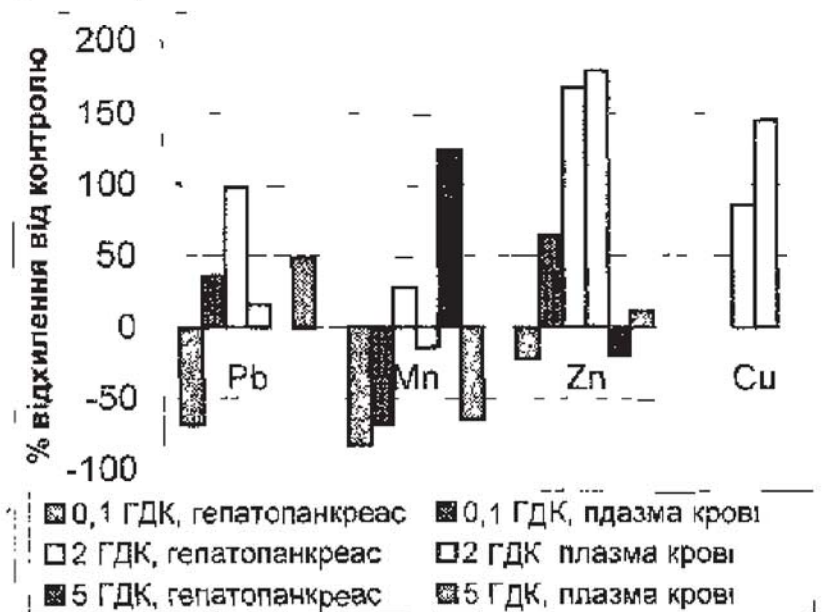


Рис. 2. Вплив іонів важких металів на окиснювальну модифікацію білків в організмі коропа (одиниці оптичної густини при 430 нм / г білка).

Традиційно токсичну дію йонів важких металів пояснюють на підставі спільних рис їх електронної будови [5-9]. Йони важких металів вважаються активаторами процесів неферментного перекисного окиснення біомолекул на тій підставі, що метали змінної валентності, якими є переважна більшість важких металів, легко віддають електрон, і здійснюють неферментний каталіз в процесах вільнорадикального окиснення [3, 5, 9]. В експериментальних умовах як ініціатор окиснення ліпідів і білків використовують, наприклад, йони заліза [3]. Однак цей механізм дії не може бути застосований для пояснення впливу цинку, який має стабільну валентність 2, не зважаючи на це, здійснює найбільший з досліджуваних металів вплив на окиснення білків в організмі коропа. Поряд з цим, при поясненні результатів нашого експерименту слід враховувати, що зміни показників, які спостерігаються після 14 діб витримування риб в токсичному середовищі, є сумарним результатом прямого впливу токсиканту на досліджувані молекули та адаптивних змін, викликаних цим фактором в організмі [2].

Проведені нами раніше дослідження впливу йонів важких металів на ферментні і неферментні фактори антиоксидантного захисту та вміст продуктів ЦОД в гепатопанкреасі і крові коропа також показали, що найзначіші негативні зміни цих показників викликають цинк і мідь, а свинець і, особливо, манган, впливають на них значно менше, і навіть, оптимізують показники антиоксидантно-прооксидантного стану організму, не зважаючи на еквівалентний ступінь ураження організму в цілому, згідно встановленої величини ГДК [10, 11].

Тому одержані результати дозволяють узагальнити, що чотири досліджувані метали-забруднювачі за дією на антиоксидантно-прооксидантний статус організму коропа можна об'єднати в дві групи: мідь і цинк та свинець і манган. Спільними рисами для металів цих груп є те, що мідь і цинк вводяться в організм і стабільні у найвищому позитивному, властивому їм ступені окиснення, а свинець і манган -- в найнижчому позитивному ступені окиснення. Одержані результати показують, що метали першої з цих груп, не зважаючи на те, що цинк не проявляє змінну валентність, ініціюють перекисне окиснення як ліпідів так і білків, причому на окиснення білків більший вплив спричинює цинк, а на ліпиди та активність ферментів антиоксидантного захисту -- мідь [11]. Метали, об'єднані в другу групу, впливають незначно на перекисне окиснення біомолекул, або пригнічують його, що яскраво видно на прикладі мангану. Ці закономірності проявляються як при дії 2 ГДК, так і 0,1 та частково 5 ГДК металів на організм, а також, в дослідях *in vitro* [12].

Отже, результати вивчення впливу йонів важких металів на процеси окисної модифікації білків показують, що ступінь цих змін узгоджується із змінами інших показників оксидативного стресу організму коропа цим металом. Індивідуальна специфіка дії металу проявляється при його дозах, відмінних в 20 разів за концентрацією. Визначення показників окиснення білків при дії йонів важких металів на організм коропа може служити інформативним тестом при оцінці стану адаптації організму до забруднення.

Висновки

1. Йони мангану при дії в сублетальних концентраціях викликають активацію антиоксидантних чинників захисту структури білків гепатопанкреасу та плазми крові коропа.
2. Йони цинку і міді при дії в сублетальних концентраціях збільшують інтенсивність окиснення білків в гепатопанкреасі та плазмі крові коропа, а йони свинцю меншою мірою, ніж інші досліджувані метали, впливають на цей процес.
3. Ступінь окиснювальної модифікації білків є чутливим тестом для оцінки антиоксидантно-прооксидантного статусу організму коропа при дії важких металів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вороб'єв В.И. Микроэлементы и их применение в рыбководстве — М. Пищевая промышленность — 1979 — 183 с.
2. Грubicко В.В. Интегральні біохімічні показники для оцінки екологічної небезпечності токсикантів // Науково-технічний бюллетень інституту землеробства і біології тварин. Серія Фізіологія і біохімія -- Львів 1999 -- Вип. 1(3) — С. 253-256

3. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Порогов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // *Вопр. мед химии* — 1995 — № 1 — С. 24-25.
4. Курант В.З., Бродін С.В., Силко Ю.В. та ін. Особливості метаболізму амінокислот в організмі риб за умов інтоксикації йонами міді // *Науково-технічний бюлетень Інституту землеробства і біології тварин УААН* Львів, 1999 Вип 1(2) С.122-127
5. Кухтина Е.Н., Глушенко П.И. Влияние железа, цинка, меди на процессы перекисного окисления липидов печени *in vivo* // *Биохимия* — 1996 — Т. 61, № 6 — С. 993-997
6. Леус Ю.В., Грубішко В.В. Активність антиоксидантної системи карпа при діянні важких металів // *Гидробиол журн.* — 1998 — Т. 34, №2. — С. 59-63.
7. Мещишин І.Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові // *Буковинський медичний вісник* 1998. - Т. 2, № 1. С. 156-158
8. Ойвин И.А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований // *Патол. физиология и эксперим. терапия* — 1960 — № 4 — С. 76-85
9. Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и их роль в организме // *Усп биол химии* — М. Наука, 1990 Т. 31. С. 180-208
10. Столяр О. Б., Зінковська Н. Г. Вплив йонів свинцю і марганцю на активність антиоксидантних ферментів та перекисне окиснення ліпідів у коропа // *Наукові записки Тернопільського педагогічного університету. Серія Хімія* -- 1999. — № 3 — С. 51-55
11. Столяр О. Б., Зінковська Н. Г., Грубішко В. В., Зінчук В. М., Рудик О. В. Вплив йонів міді і цинку на перекисне окиснення ліпідів і антиоксидантний статус в організмі коропа // *Біологія тварин* 1999 Т. 1, № 2 С. 84-89
12. Столяр О. Б., Курант В. З., Зінковська П. Г., Дрель В. Р. Вплив йонів важких металів на процеси перекисного окиснення в біологічних системах в умовах *in vitro* // *Наукові записки Тернопільського педагогічного університету Серія Хімія.* — Тернопіль, 1998 — № 2 — С. 50-56.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J Biol Chem.* - 1951 — Vol. 191, N 1 — P. 265-275
14. Radt A. A. R., Matkovic B. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues // *Comp Biochem Physiol* -- 1988 -- 90C, N 1 -- P. 69-72
15. Walton M. J., Cowery C. B. Methionine metabolism in Rainbow Trout // *J. Nutr* 1982 Vol. 12, N 1. - P. 1525-1535.

O. B. Stolyar

OXIDATIVE MODIFICATION OF CARP HEPATOPANCREAS AND BLOOD PLASMA PROTEINS UNDER THE HEAVY METALLS INFLUENCE

We have investigate the influence of lead (0.01, 0,2 and 0.5 mg/l) manganese (0.13, 2,6 and 6,5 mg/l), zinc (0,1, 2,0 and 5,0 mg/l) and copper (0,2 mg/l) ions for up 14 days upon the common carp (*Cyprinus carpio L.*). The concentrations of metalls were 0,1, 2 and 5 MPC. We studied the level of protein oxidative modification of hepatopancreas and blood plasma. The results show that manganese ions caused the antioxidant protection of proteins. The zinc and copper ions increased the level of protein oxidation and the rate of changes, caused by the lead, wasn't such significant as for other metalls. The level of protein oxidative modification in carp tissues may serve as an adequate test for estimation of the antyoxydant-prooxydant status of organism under the heavy metalls influence

Надійшла 15.01.2001