

БІОХІМІЯ

УДК [549.29+577.352.4]582.263

К.В.КОСТЮК, В.В. ГРУБІНКО

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

ВПЛИВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА АТФ-АЗНУ АКТИВНІСТЬ У *CHLORELLA VULGARIS* BEIJER.

Досліджено АТФ-азну активність у одноклітинній зеленій водорості *Chlorella vulgaris* Beijer за дії підвищених концентрацій іонів цинку та свинцю у водному середовищі. Встановлено, що функціонування АТФ-аз за дії металів знижується. Чутливішою до металів була Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-аза.

Ключові слова: іони цинку і свинцю, *Chlorella vulgaris* Beijer, АТФ-ази

Токсичність хімічних речовин для організмів визначається низкою механізмів, серед яких зміна проникності клітинних мембран та інгібування мембранних ферментів є одним з визначальних для їх виживання [13]. Іонтранспортні системи клітин гідробіонтів тісно пов'язані з функціональним станом організму і визначають його адаптивний потенціал у зміненому середовищі [15]. Показником функціональної цілісності і ефективності клітинних мембран є АТФ-ази, що беруть участь у реалізації транспортних процесів [1, 16].

Метою роботи було дослідження впливу іонів цинку та свинцю на активність загальної та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-аз в часовому та концентраційному вимірі, а також завдяки цим ферментам, які є ще й біологічними маркерами, з'ясувати стан клітинних мембран.

Матеріал і методи досліджень

Досліди проводили на одноклітинній водорості *Chlorella vulgaris* Beijer., яку вирощували в умовах накопичувальної культури в люменостаті при освітленні лампами денного світла (2500 лк) і температурі $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Як живильне середовище використовували розчин Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горхема (№ 11) [12]. В дослідженні використано солі біогенного цинку та типового ксенобіотика – свинцю. В експериментальних умовах до культури водоростей додавали водні розчини ZnSO_4 та $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ з розрахунку на кількість іонів: Zn^{2+} – 1 мг/дм³, 2 та 5 мг/дм³; Pb^{2+} – 0,1 мг/дм³, 0,2 та 0,5 мг/дм³, що відповідає 1, 2 і 5 ГДК за рибогосподарським показником шкідливості [4]. Контролем була культура, яка росла на середовищі без додавання іонів будь-яких важких металів. Виділення мембран здійснювали за методом Дж. Фіндлея та У. Еванза [16].

Для вивчення активності мембранних АТФ-аз готували гомогенати клітин (клітини відділяли від середовища за допомогою мембранних фільтрів Синпор № 4) на 0,005 трис-НСІ буфері (рН 7,6) у співвідношенні 1:5 (сира біомаса: об'єм буферу) в механічному гомогенізаторі за швидкості 7000 об/хв. Для отримання ферментної витяжки гомогенати центрифугували за швидкості 5000 об/хв. протягом 15 хв. У подальших експериментальних дослідженнях використовували надосадову суспензію. Всі процедури здійснювали за охолодження до 4°C .

Реакційна суміш для визначення активності АТФ-аз за наростанням неорганічного фосфату [19] містила: 0,5 мл 40 мМ трис-НСІ-буфер, 0,1 мл 5 мМ АТР, 0,1 мл 20 мМ КСІ (для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази – 0,1 мл 100 мМ КСІ), 0,1мл 100 мМ NaCl (для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази – без NaCl, але з оубаїном об'ємом 0,1 мл), 0,1 мл 5 мМ MgCl_2 і 0,2 мл гомогенату. Час інкубації становив 40 хв. Для зупинення реакції додавали 0,4 мл 10% розчину ТХОК і центрифугували при 3000 г протягом 10 хв. Після цього до центрифугату додавали 1,5 мл 1 М ацетатного буферу, 0,2 мл 25% розчину молібдату амонію і 0,2 мл 2% розчину аскорбінової кислоти та витримували 20 хв., після чого фотометрували при довжині хвилі 700 нм. Активність ферменту визначали у мкмоль Рн/мг білку* год.

Визначення вмісту білків здійснювали за Лоурі та співавт. [20]. Одержані експериментальні дані опрацьовані методами варіаційної статистики [10].

Результати дослідження та їх обговорення

Як показали результати дослідження, токсичність ВМ для водорості визначається фізико-хімічними властивостями іонів металів, їх концентрацією, тривалістю дії та опірністю клітинної мембрани (рис. 1). Загалом ВМ інгібують АТФ-азну активність. Це узгоджується даними інших досліджень [1, 2, 5-7, 18, 19]. Проте в дії обох металів відмічена суттєва різниця. Зокрема, іони цинку протягом першої доби не викликають помітних змін активності ферменту. На цитологічному рівні це проявляється ущільненням та асиметричному потовщенні мембран, а також виділенням слизу клітинними оболонками водоростей, що зумовлюють на певний час непроникність мембран для токсиканту. Однак уже на третю і сьому доби дії спостерігали зниження АТФ-азної активності, що зумовлено потраплянням іонів цинку до клітини. Відомо, що останні можуть утворювати комплекси з різними фізіологічно активними речовинами-лігандами: білками, амінокислотами, АТФ, АДФ, моноцукрами, вітамінами тощо [11]. Тому пояснити інгібування цинком ферментної активності найімовірніше утворенням комплексу з АТФ, який є субстратом для АТФ-аз. Не виключено, що АТФ-аза інгібується цинком внаслідок антагоністичного заміщення ним інших металів у ферменті. На чотирнадцяту добу загальна активність АТФ-аз зростає, що свідчить про відновлення властивостей ферменту або мембрани в цілому, а також про можливе виведення токсиканту з клітини, оскільки іони цинку добре комплексується фосфатними групами, які відщеплюються від нуклеїнових кислот і ліпідів, в результаті чого Zn^{2+} переходить у форму малорозчинних і менш отруйних органічних фосфатів і легко виводиться з клітин [11]. Вважають, що організми, які живуть у багатому на цинк середовищі, володіють механізмами стійкості до цього металу на генетичному рівні, захищаючи при цьому транспортувальні системи від надлишку іонів цинку, блокуючи їх надходження [11, 18].

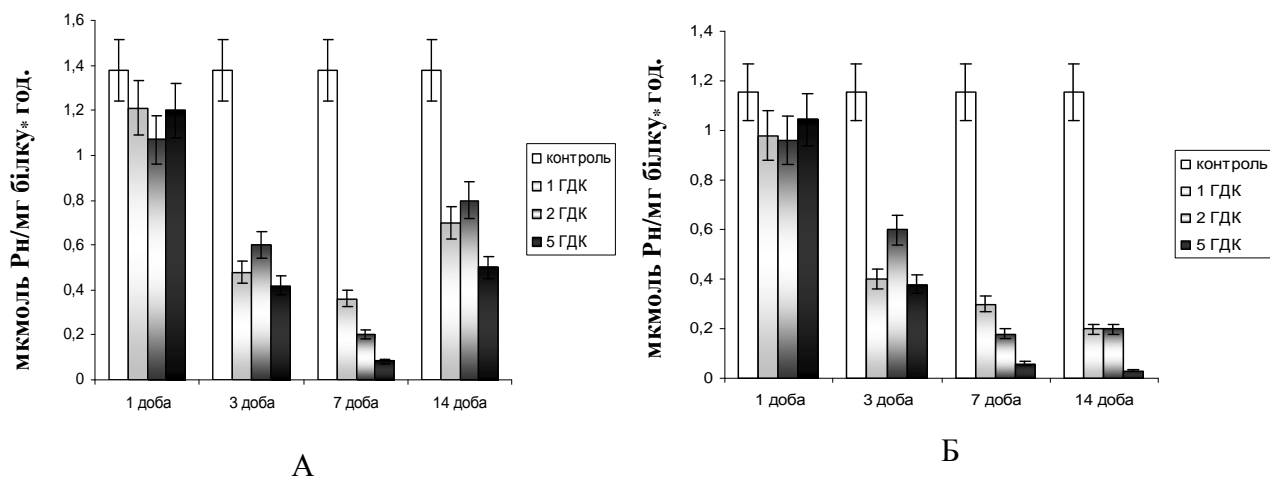


Рис. 1. Вплив іонів цинку на загальну АТФ-азну активність (А) та Ca, Mg-АТФ-азу (Б) у *Chlorella vulgaris* Beijer, $M \pm m$; $n=5$

Щодо Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази (рис.1, Б), то вона повторює динаміку зниження загальної АТФ-азної активності, проте на чотирнадцяту добу дії цинку її рівень не відновлюється. Пояснити цей факт можна тим, що двовалентні катіони можуть деактивувати Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азу як за рахунок модифікацій залишку аргініну, так і аміно- та сульфгідрильних груп, що знаходяться поблизу субстратних центрів [14]. Встановлено [7-9], що така закономірність характерна не лише для хлорели, а й для інших гідробіонтів [14]. Отже, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-аза є більш чутливішою до дії металу та динамічних перебудов мембран.

Відомо, що вплив свинцю пов'язаний з руйнівною дією на клітинні оболонки та інактивуючою здатністю щодо мембранних ферментів [3]. В нашому експерименті встановлено (рис. 2), що свинець проявляє інгібуючу дію щодо всіх досліджуваних АТФ-аз. АТФ-азна активність порівняно з контролем зменшується дозозалежно за винятком першої доби, коли має місце зростання активності ферменту за рівня іонів свинцю 5 ГДК порівняно з іншими концентраціями, що можна пояснити комплексоутворюючими властивостями іонів у перенасичених розчинах.

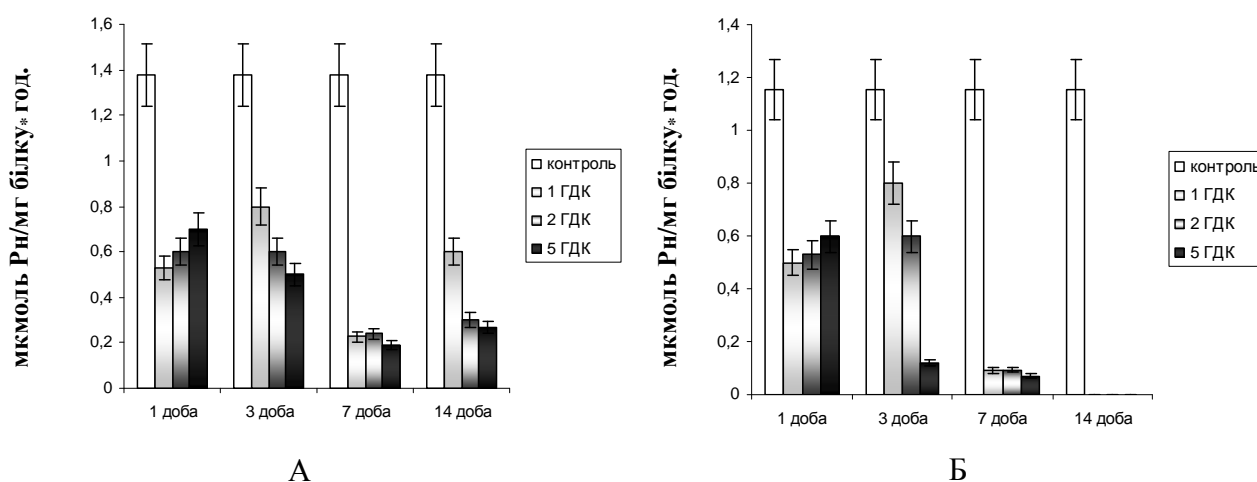


Рис. 2. Вплив іонів свинцю на загальну АТФ-азну активність (А) та Ca , Mg -АТФ-азу (Б) у *Chlorella vulgaris* Beijer, $M \pm m$; $n=5$

Можливо, що при цьому має місце включення свинцю в активні центри АТФ-аз. Наочно це виявляється у Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази, яка дезактивується свинцем протягом всього часу дії, а на чотирнадцяту добу активність ферменту взагалі не виявляється. Можливо, що Na^+ , K^+ -АТФ-аза є менш чутливою до дії металу, за рахунок чого загальна АТФ-азна активність знаходиться майже на тому ж рівні, що і на сьому добу.

Інгібування активності АТФ-аз катіонами металів, як відомо, супроводжується змінами ультраструктурної організації клітин, що найпомітніше виявляються на мембранному рівні. Згідно наших спостережень, ці зміни насамперед пов'язані з відновленням мембрани. Так, пошкодження мембран призводить до їх пізнішого потовщення та утворення нової функціонально-активної вторинної мембрани. Такий процес закладений в основі адаптаційних властивостей багатьох організмів за екстремального впливу.

Висновки

Цинк і свинець інактивують мембранні АТФ-ази хлорели. Ступінь пригнічення АТФ-азної активності іонами свинцю є вищою, ніж іонами цинку.

Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-аза є чутливішою до дії досліджених іонів, що, можливо, пов'язано з заміщенням у її молекулі двовалентних металів іонами цинку та свинцю.

Костюк К. В., Грубинко В. В.

Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка, Украина

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА АТФ-АЗНУЮ АКТИВНОСТЬ У *CHLORELLA VULGARIS* BEIJER.

Исследовали АТФ-азную активность у хлореллы *Chlorella vulgaris* Beijer при действии повышенных концентраций ионов цинка и свинца. Оба металла ингибируют мембранные АТФ-азы хлореллы. Степень угнетения АТФ-азной активности ионами свинца больше, чем ионами цинка. Отмечена более высокая чувствительность к металлам Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азы.

Ключевые слова: ионы цинка и свинца, *Chlorella vulgaris* Beijer, АТФ-азы

R.V. Kostyuk, V.V. Grubinko

Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine

INFLUENCE OF HEAVY METALS ON ATF-AZE ACTIVITY AT *CHLORELLA VULGARIS* BEIJER.

ATF-aze activity for *Chlorella vulgaris* Beijer at the action of enhanceable concentrations of ions of zinc and lead. Both metals reduce activity membrane ATF-aze of chlorella. Degree of oppressing of ATF-aze of activity by the ions of lead more than by the ions of zinc. More high sensitiveness is marked to the metals of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATF-aze.

Key words: zinc, lead,, *Chlorella vulgaris* Beijer, ATP-ase

1. Бойко Н. Вплив йонів важких металів на активність Na^+ , K^+ -АТРази та динаміку трансмембранного потенціалу зародків в'юна / Н.Бойко, М. Целевич, Д. Санагурський // Вісник Львів. ун-ту. Серія: Біологія. – 2002. – Вип. 29. – С. 25–31.
2. Бойко Н. Активність Na^+ , K^+ -АТРази мембран зародків в'юна за дії катіонів важких металів / Н.Бойко, М. Целевич, Д. Санагурський // Укр. біохім. журн. – 2004. – 76, №2 – С. 59–63.
3. Грубинко В.В. Интегральная оцінка токсичного ураження у біологічних системах / В.В. Грубинко // Наук. рап. ТНПУ ім. В. Гнатюка. Сер. Біологія. Спец. випуск „Гідроекологія”. – 2005. – № 3(26). – С. 111-114.
4. Давыдова С.Л. Тяжелые металлы как супертоксиканты XXI века: Учебн. пос. / С.Л.Давыдова, В.И.Тагасов. – М., 2002. –140 с.
5. Дубицький Л. О. Взаємодія катіонів металів з Ca^{2+} -транспортувальними центрами Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани секреторних клітин шлункових залоз / Л.О. Дубицький, Л.С. Вовканич // Укр. біохім. журн. – 2003. – 73, №2. – С. 39–45.
6. Івашків Л.Я. Дисперсійний аналіз впливу Cd^{2+} , Zn^{2+} та Mn^{2+} на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази мембран зародків в'юна / Л.Я. Івашків, М.В.Целевич, Н.М. Бойко, Д.І. Санагурський // Укр. біохім. журн. – 2005. – Т. 77, №3. – С. 44–48.
7. Костюк К. В. Вплив іонів Zn^{2+} та Pb^{2+} на активність АТФ-аз у одноклітинної водорості *Desmodesmus complanis* (*Scenedesmus quadricauda*) Brev. / К.В. Костюк, О.І. Боднар, В.В. Грубинко // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер.: Біологія. – 2008. – Вип. 2 (36). – С. 143–148.
8. Костюк К.В. Вплив нафтопродуктів на АТФ-ази зябер коропа / К.В. Костюк // Тези Міжн. наук.-практ. конф. "Шевченківська весна" студ., асп. та молодих вчених. – К., 2008. – Ч.1. – С. 58–60.
9. Костюк К.В. Влияние фульвокислот на АТФ-азную активность у хлореллы (*Chlorella vulgaris* Beijer) / К.В. Костюк, О.В. Василенко, Т.А. Васильчук, В.В. Грубинко // Всеросс. конф. с участием специал. из стран ближнего и дальнего зарубежья “Современные проблемы водной токсикологии”. 11-16 ноября 2008 г., Борок: Тез. докл. – Борок, 2008. – С.73–76.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.
11. Леменовский Д. А. Соединения металлов в живой клетке / Д.А. Леменовский // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 9. – С. 48–53.
12. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Под ред. А.В. Топачевского. – К.: Наук. думка, 1975. – 247с.
13. Никаноров А.М. Биомониторинг тяжелых металлов в пресноводных экосистемах / А.М. Никаноров, А.В. Жулидов, А.Д. Покаржевский. – Л.: Гидрометеиздат, 1985. – С. 48-56.
14. Ротт Н.Н. Клеточные циклы в раннем эмбриональном развитии / Н.Н. Ротт. – М.: Наука, 1987. – 207 с.

15. Целевич М. Аналіз змін сумарної Са, Mg-АТФ-азної активності зародків в'юна внаслідок впливу катіонів двовалентних металів / М. Целевич, Р. Фафула, М. Галан, Д. Санагурський // Вісник Львів. ун-ту. Сер. Біологія. – 2007 – Вип. 44. – С.22–30.
16. Фіндлей Дж. Биологические мембраны. Методы / Дж. Фіндлей, У.Еванз. – М.: Мир, 1990.– 423 с.
17. Barron M. G., Albeke S. Calcium control of zinc uptake in rainbow trout // Aquat. Toxicol. – 2000. – Vol. 50, № 3. – P. 257– 264.
18. Briskin D.P. The Plasma Membrane H⁺-ATPase of Higher Plant Cells // Biochim. et biophys. acta. – 1990. – № 2. – P. 95–109.
19. Dang Z., Lock R.A.C., Flik G. Na⁺/K⁺-ATP-ase Immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper // J. Exp. Biol. — 2000. — Vol. 203. — P. 379 – 387.
20. Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265-275.

Рекомендує до друку

Надійшла 17.02.2010

В.З. Курант

УДК 591.84+577.12+566.173

Н.С. ХОПТА, Г.М. ЕРСТЕНЮК

Івано-Франківський національний медичний університет
вул. Галицька, 2, Івано-Франківськ, 76018

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ЩУРІВ ЗА УМОВ НІТРИТНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

Досліджували вплив нітриту натрію на метаболічні процеси кісткової тканини білих безпородних щурів. Ксенобіотик вводили з питною водою в дозі 1/10 LD50. Визначали фотометрично в плазмі крові рівень загального, іонізованого і зв'язаного кальцію, магнію, фосфатів, активності ферментів лужної і кислої фосфатаз, концентрацію оксипроліну, а також методом атомної абсорбції вміст в стегнових кістках тварин макроелементів кальцію і магнію, остеотропних мікроелементів - цинку і міді, токсичного елементу кадмію на 1, 14 і 28-й день після завершення введення ксенобіотика. Результати дослідження показали, що нітритна інтоксикація викликає розвиток дезмікроелементоза, який супроводиться дисбалансом макро- і мікроелементів в стегновій кістці уражених тварин: істотно зменшується вміст кальцію, цинку і міді, а магнію збільшується. Виявлено накопичення в стегнових кістках експериментальних тварин кадмію. Надходження в організм нітриту натрію викликало зміну показників кальцій-фосфорного обміну в плазмі крові, активності лужної і кислої фосфатаз та рівня маркерної амінокислоти обміну колагену оксипроліну. Результати свідчать про порушення метаболізму кісткової тканини в умовах нітритної інтоксикації.

Ключові слова: Нітритна інтоксикація, кісткова тканина, макроелементи, мікроелементи, біохімічні маркери метаболізму кісткової тканини

Вже не одне десятиліття нітрати і нітрити займають пріоритетне становище серед забруднювачів довкілля, що є наслідком інтенсифікації сільського господарства, недосконалості очисних споруд, порушення технології зберігання і використання азотних добрив, забруднення повітря оксидами нітрогену тощо. Зростання вмісту нітратів у воді, повітрі та біосистемах призводить до збільшення надходження їх в організм людини [3, 7, 16]. За оцінками експертів ВООЗ у розвинених країнах людина щоденно одержує з продуктами харчування та питною водою до 400 мг нітрат-іону (NO₃⁻), при чому безпечною вважають дозу, що не перевищує 5 мг на 1 кг маси тіла людини (тобто 300-350 мг/добу) [2, 3]. Основна маса нітратів потрапляє до організму людини із питною водою, свіжими овочами і фруктами. Це становить за оцінками різних авторів 40-90% добової кількості нітратів [3]. Інші джерела –