

# БІОХІМІЯ

УДК 574.5:504.054

**О.Б. Столяр, Р.Б. Балабан**

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

## **ВМІСТ МАРГАНЦЮ В НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ СПОЛУКАХ ГЕПАТОПАНКРЕАСУ КОРОПА ТА ЇХ ВЛАСТИВОСТІ ПРИ ДІЇ МАРГАНЦЮ (II) НА ОРГАНІЗМ**

*короп, марганець (II), гепатопанкреас, низькомолекулярні термостабільні білки, метилотіонеїни, тіолі*

Марганець вважається одним з найменш токсичних мікроелементів. Однак, у поверхневих водах України для нього характерні досить широкі інтервали коливань вмісту і значно менший рівень закомплексованості порівняно з іншими важкими металами [5]. Поряд з тим, контролю його концентрації у воді та токсичності для гідробіонтів не приділяється великої уваги [8]. Марганець має широкий спектр біологічної дії. Щодо проявів токсичності марганцю (II) результати протирічні. Відзначають, що він викликає зміни ензиматичного статусу організму, що пов'язано з специфічним дією на ферменти форми глутатіону [3, 9, 10], впливає на утворення продуктів окиснення білків і ліпідів, зокрема в гепатопанкреасі коропа, причому напрямки змін залежить від дози металу [6, 9]. Тому представляє інтерес з'ясувати можливість зв'язування надлишку цього металу в організмі в малотоксичні комплекси залежно від його концентрації в середовищі. Відомо, що в більшості тваринних організмів для важких металів таким депо служать низькомолекулярні термостабільні білки (НТБ) металотіонеїни (МТ) [2]. В гепатопанкреасі коропа ці білки зв'язують цинк, мідь, кадмій, однак про участь МТ у зв'язуванні марганцю не повідомляється [12]. У зв'язку з цим метою нашого дослідження було вивчення стану МТ та інших НТБ в гепатопанкреасі коропа при дії на організм різних сублетальних концентрацій марганцю (II). Для характеристики токсичності марганцю визначали також вміст білкових SH-груп та відновленого глутатіону (GSH) в тканині.

### **Матеріал і методика досліджень**

Дослідження проводились на коропі лускатому (*Cyprinus carpio L.*) масою 200 — 250 г. Риб утримували у басейнах протягом 14 діб при температурі близько 18° у відстояній, добре аерованій воді, яку змінювали щодобово. Вміст у воді марганцю (II) у вигляді хлориду становив— 0,12, 2,4 і 6,0 мг/л. НТБ виділяли з 10%-ного гомогенату гепатопанкреасу як описано в [7]. НТБ розділяли на фракції за допомогою хроматографії на сефадексі G-75 ("Pharmacia"). Умови елюції описані в [7]. МТ ідентифікували як НТБ із високим показником співвідношення світлопоглинання  $D_{254}/D_{280}$  [2, 12]. Калібровку колонки здійснювали за допомогою білків з відомою M, виробництва фірми Sigma- сывороткового альбуміну (67,0 кДа), міоглобіну (16,9 кДа), цитохрому c (12,3 кДа) та інсуліну (5,8 кДа).

Концентрацію загальних білків після їх виділення [7], НТБ та білків в їх фракціях визначали методом Лоурі [11]. Вміст загальних білкових тіолів, SH-груп в фракціях НТБ та GSH визначали за допомогою реактиву Елмана [13]. Вміст металу у розчині НТБ та їх фракціях вимірювали на атомно-абсорбційному спектрофотометрі С-115. Результати визначення

показників фракцій НТБ подані як усереднені значення двох – трьох вимірів [12]. Інші результати обробляли статистично.

**Результати досліджень та їх обговорення**

Результати досліджень показали, що вміст НТБ в гепатопанкреасі коропа становить близько 3-4 % від загального вмісту білків в тканині (табл. 1). В результаті хроматографії на сефадексі G-75 НТБ утворюють дві основні фракції (I і III) з  $M_r$  відповідно біля 67 і 6 кДа і слабо виражену проміжну з  $M_r$  біля 12 кДа. III фракція НТБ ідентифікована як МТ [2, 12]. Низькомолекулярні компоненти гепатопанкреасу в нормі містять близько 40 – 50% марганцю тканини, причому він переважно зосереджений у складі МТ (табл. 2).

Таблиця 1

**Вміст білків в гепатопанкреасі коропа при дії марганцю (II) протягом 14 діб,  $M \pm m$ ,  $n=5$**

Вміст марганцю у воді, мг/л	Загальні білки, мг/г тканини	Низькомолекулярні термостабільні білки, мг/г тканини	Низькомолекулярні термостабільні білки, % від загального вмісту білків
Контроль	75,0±4,7	2,36±0,28	2,92±0,22
0,12	84,5±5,6	2,62±0,07	3,14±0,16
Контроль	98,4±7,2	3,31±0,30	2,53±0,35
2,4	103,5±7,4	3,75±0,40	2,77±0,32
Контроль	126,2±3,2	5,00±0,55	4,44±0,29
6,0	87,0±6,4*	3,68±0,39	4,67±0,31

Примітка до табл. 1 – 4.\*Відмінності порівняно з контролем виражені,  $p < 0,05$ . X — не визначали

За дії марганцю (II) на коропа вміст білків в гепатопанкреасі, як загальних, так і НТБ, залишається в межах норми у всіх дослідних серіях, крім дії самої високої концентрації металу (див. табл. 1). Загальний вміст марганцю в тканині змінюється від зменшення до збільшення порівняно з контролем по мірі збільшення концентрації металу у воді. Разом з тим, його вміст в організмі розширює НТБ збільшується порівняно з контролем у всіх досліджуваних умовах інтоксикації (див. табл. 2)

Таблиця 2

**Вміст марганцю в гепатопанкреасі коропа та його низькомолекулярних компонентах при дії на організм марганцю (II)**

Вміст марганцю у воді	Вміст марганцю в тканині, мкг/г тканини	Вміст марганцю в розчині низькомолекулярних термостабільних білків, мкг/г тканини	Вміст марганцю в компонентах розчину низькомолекулярних термостабільних білків, мкг/г тканини		
			I фракція	III фракція	Інші компоненти розчину
Контроль	0,758±0,064	0,317±0,042	0,049	0,315	0
0,12 мг/л	0,486±0,035*	0,445±0,054	0,101	0,355	0
Контроль	1,173±0,099	0,557±0,102	0,049	0,315	0,193
2,4 мг/л	1,473±0,097	1,130±0,152*	0,180	0,210	0,740
Контроль	0,700±0,045	0,500±0,042	X	X	X
6,0 мг/л	1,301±0,111	0,824±0,068*	X	X	X

Надлишок металу зв'язується переважно з білками I фракції та небілковими компонентами розчину. В складі МТ вміст металу збільшується при дії 0,12 мг/л і зменшується порівняно з контролем при дії 2,4 мг/л. Проте МТ залишаються найбільш важливими його лігандами у всіх досліджуваних умовах. При дії 6,0 мг/л марганцю на організм визначали також вміст заліза в розчині НТБ. Він вдвічі зменшується при інтоксикації: з 26,02±3,06 в нормі до 13,78±1,02 мкг/г тканини. Таким чином, здатність МТ зв'язувати марганець обмежена і найкраще проявляється при дії найменшої досліджуваної дози. Зростання концентрації металу в тканині приводить до його зв'язування з іншими неспецифічними лігандами. Подібні закономірності розподілу металу в гепатопанкреасі ми спостерігали і при дії на коропа міді у відповідних концентраціях (0,1, 2 і 5 ГДК) [7].

Для характеристики впливу акумуляції марганцю на властивості його лігандів ми визначали вміст в них SH-груп. Визначення їх вмісту в загальних білках гепатопанкреасу при

дії 2,4 та 6,0 мг/л марганцю у воді виявило зростання цього показника порівняно з нормою (табл. 3).

Таблиця 3

**Характеристика фракцій низькомолекулярних термостабільних білків гепатопанкреасу коропа, одержаних за допомогою хроматографії на сефадексі G-75, при дії на організм марганцю (II) протягом 14 діб**

Показник	Група тварин	Фракція низькомолекулярних термостабільних білків		
		I	II	III
Об'єм, % від загального об'єму фракції	Контроль	45,7	3,8	50,5
	0,12	46,5	2,1	51,4
	Контроль	54,6	6,5	32,4
Вміст білків, мг/мл сироватки	2,4	32,8	0	56,1
	Контроль	0,18	0,10	0,17
	0,12	0,06	0,10	0,28
Вміст тіолів, нмоль/мл білку	Контроль	0,22	0,10	0,24
	2,4	0,09	0	0,20
	Контроль	31,5	27,6	18,4
Вміст тіолів, нмоль/мл білку	0,12	30,7	14,0	14,0
	Контроль	32,2	86,8	70,8
	2,4	291,3	0	338,0

Вміст SH-груп у фракціях НТБ, виділеніх методом гел-хроматографії (табл. 4), при дії 2,4 мг/л металу також зростає, тоді як при дії 0,12 мг/л близький до норми. Збільшення вмісту білкових тіолів в гепатопанкреасі, відзначене нами при дії порівняно високих концентрацій металу на організм, може свідчити про суттєві зміни в їх структурі. Вміст GSH в тканині не зазнає змін порівняно з контролем при всіх досліджуваних концентраціях металу (див. табл. 3). Окрім в умовах досліду не спостерігаються ознаки гіперманіанозу, описані в літературі для севінів [10, 11].

Таблиця 4

**Вміст тіолів в гепатопанкреасі коропа при дії марганцю (II), М±m, n = 5**

Показник	Вміст металу, мг/л води		
	Контроль	2,4	6,0
Білкові тіолі, нмоль/мл тканини	2,06±0,25	1,33±0,21	1,63±0,28
Білкові тіолі, нмоль/мл сироватки	5,88±0,77	19,26±2,79	9,95±0,66
Білкові тіолі, нмоль/мл білків	68,4±6,7	89,6±8,7*	99,9±16,3*

Іони марганцю (II) проявляють спорідненість до карбоксильних груп [4]. Можливо, саме ці групи забезпечують їх зв'язування з МТ. Особливості лігандоутворення марганцю близькі до заліза. Аналогічно до заліза він окиснюється церулоплазміном і транспортується трансферином [1]. Про конкуренцію між ними свідчить і зменшення вмісту останнього при збільшенні вмісту марганцю в тканині. Щодо природи взаємодії іонів марганцю з НТБ можна припустити, що МТ специфічно зв'язують цей метал, а надлишок його при інтоксикації високими дозами зв'язується неспецифічно, що приводить до подібних проявів у спектрах обох фракцій НТБ.

Вважають, що значний внесок у токсичність марганцю зумовлює утворення комплексу  $Mn^{2+}$  з глутатионом. При марганцевій інтоксикації організму морської свинки спостерігається зменшення приблизно в 3 рази вмісту відновленого глутатиону в печінці, тоді як в крові його вміст не зазнає змін [9]. Однак нами не відзначені істотні зміни вмісту відновленого глутатиону в гепатопанкреасі риб в умовах досліду. Проведено нами раніше дослідження окиснювальної модифікації білків гепатопанкреасу показало, що для дії на них марганцю (II) характерні дозозалежні зміни від пригнічення при дії 0,12 мг/л до зростання при дії 6,0 мг/л [6], що узгоджується із змінами вмісту самого металу в тканині.

**Висновки**

Низькомолекулярні термостабільні білки відіграють досить значну роль в акумуляції марганцю в гепатопанкреасі коропа. Найбільш ефективно вони виконують цю функцію при дії низької сублетальної дози марганцю (II) на організм. При дії більших доз металу зростає роль інших низькомолекулярних лігандів у його зв'язуванні. При цьому збільшується вміст білкових SH-груп в гепатопанкреасі.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Авцын А. П., Живоронков А. А., Ринг М. А., Строчкова Л. С. Микроэлементозы человека. М. Медицина, 1991. — 496 с.
2. Бурдин К. С., Полякова Е. Е. Металлотитонени, их строение и функция // Усп. соврем. биол. — 1987. — 103, № 3. — С. 390 — 400.
3. Лехс Ю.В., Грубінко В.В. Активність антиоксидантної системи коропа при дії важких металів. // Гідробіол. ж. — 1998. — № 2. — С. 59 — 63.
4. Ершов Ю. А., Идетенев Г. В. Механизмы токсического действия неорганических соединений. — М. Медицина, 1989. — 272 с.
5. Липник П. П. Тяжелые металлы в поверхностных водах Украины: содержание и формы миграции. — Гідробіол. журн. — 1999. — 35, № 1. — С. 22 — 41.
6. Столяр О. Б. Окислювальна модифікація білків гепатопанкреасу і плазми крові коропа за інтоксикації важкими металами. // Наукові записки Тернопільського національного університету. Серія: Біологія. — Тернопіль, 2001. — №2(13). — С. 44-49.
7. Столяр О. Б., Хоменчук В. О., Арсан В. О., Грубінко В. В. Роль низькомолекулярних сірковмісних сполук гепатопанкреасу коропа у зв'язуванні іонів міді // Доп. НАН України. — 2001. — № 3. — С.198 — 203.
8. Сытник Ю.М. Загрязнение тяжелыми металлами пресноводных рыб естественных и искусственных водоемов Украины // Н.Студ.гідроеколог. товариства України; Тез. доп., Київ, лист. 1997 р. — К.: 1997, 1, 2. — С. 151 — 152.
9. Цибрижинский О. И. Антиоксидантный статус при марганцевой интоксикации организма // Укр. биохим. журн. — 1998. — 70, № 4. — С. 79 — 84.
10. Liccione J. J., Maines M. D. Selective Vulnerability of glutathione Metabolism and cellular defense Mechanisms in rat striatum to manganese. — J. Pharmacol. Experiment. Therapeutics. — 1988. — 247, N 1 — P. 156 — 161.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. — J. Biol. Chem. — 1951. — 191, P. 265 — 275.
12. Olsson P.E., Zafarallah M., Gedamu Z. A role of metalloprotein in zinc regulation after estradiol induction of vitellogenin synthesis in Rainbow trout, *Salmo gairdneri*. // Biochem J. — 1989. — 257, № 2. — P. 555-559.
13. Sedlak J., Lindsay R.H. Estimation of total, protein-bound and non-protein sulphhydryl groups in tissue with Ellmans Reagent. — Anal. Biochem. — 1968. — 25, № 1. — P.192-205.

*O. B. Stolyar, R. B. Balaban*

**THE MANGANESE CONTENT IN THE LOW WEIGHT COMPOUNDS OF THE CARP HEPATOPANCREAS AND THEIR PROPERTIES UNDER THE MANGANESE (II) INFLUENCE ON THE ORGANISM**

The influence of exposure to 0,12, 2,4 and 6,0 mg Mn<sup>2+</sup> ions/l for up 14 days on the low weight thermostable proteins (LTP) of carp hepatopancreas, its fractions, obtained by gel-filtration on the sephadex G-75, and the accumulation of manganese in them has been investigated. The results show that the concentration of the hepatic total proteins and LTP isn't change under the manganese action. The manganese binds previously with LTP, specifically with metallothioneins. The manganese content in the LTP is increased under the intoxication. But the properties of MT aren't significantly change under the control value.

*Надійшло 12.01.2001*

УДК 546:597.554:547.963.3

**В.З. Курант**

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

**ВПЛИВ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ СВИНЦЮ НА ДИНАМІКУ ВМІСТУ БІЛКІВ І НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ В ОРГАНІЗМІ КОРОПА**

*прісноводні риби, свинець, білки, нуклеїнові кислоти*

Спостереження останніх років свідчать про те, що біологічна специфіка поверхневих водойм, яка значною мірою визначає якість води в них, пов'язана не тільки з концентрацією азоту, фосфору, сірки, кремнію та інших біогенних елементів, але і з вмістом біометалів та