

БІОХІМІЯ

УДК (582.26:577.12):58.04

О. І. БОДНАР, Г. Б. КОВАЛЬСЬКА, О. О. СМАЛЮК, Л. А. ОНУФРІЙЧУК,
В. Б. ВОЙТЮК

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

ЗМІНИ МЕТАБОЛІЗМУ У *CHLORELLA VULGARIS* Beij (*CHLOROPHYTA*) ЗА ДІЇ СПОЛУК ХРОМУ ТА СЕЛЕНУ

Досліджували вплив натрію селеніту окремо та спільно з іонами хрому (Cr(III)) на метаболізм *Chlorella vulgaris*. Визначено, що вплив мікроелементів викликав активізацію пігментних систем в цілому, але при цьому мало місце збільшення відносної кількості хлорофілу *b* як більш стійкого до чинників навколишнього середовища. Також спостерігалось зростання кількості каротиноїдів. Також виявилися зміни і у функціонуванні комплексу метаболічних перетворень, пов'язаних з процесами енергозабезпечення клітини *Ch. vulgaris*. Селеніт натрію окремо та за спільної дії з іонами хрому(III) стимулювали енергетичні ланки метаболізму хлорели шляхом активування цитохромоксидази та сукцинатдегідрогенази, однак пригнічували активність як НАДН-, так і НАДФН-глутаматдегідрогеназ. З'ясовано, що за дії селену окремо в адаптивній перебудові антиоксидантного статусу клітин хлорели провідною є роль глутатіонпероксидази, тоді як спільно з іонами хрому підвищується участь каталази та супероксиддисмутази. Загалом, підібрані концентрації досліджуваних мікроелементів – 10,0 мг (Se(IV))/дм³ та 5,0 мг (Cr(III))/дм³, не зважаючи на їх токсичну природу, дають змогу зберегти фотохімічну життєздатність та метаболічну активність хлорели, не спричиняючи загибелі клітин водорості.

Ключові слова: водорості, селен, хром пігменти, енергетичний метаболізм, антиоксидантна система

У сучасній фармації продукти з водоростей широко використовуються для отримання біологічно активних добавок і фармацевтичних препаратів [4, 15, 37]. Значний інтерес становлять комплекси есенційних неметалів та металів, що надходять у харчові ланцюги людини і тварин через рослини і відіграють значну роль у метаболізмі, який порушується при їх дефіциті [14, 25, 33]. Їх поповнення аліментарним шляхом не завжди можливе, тому БАДи на основі водоростей, до складу яких входять метали та неметали, а, особливо, їх комплекси, знайшли широке застосування в клінічній практиці [1, 15, 25].

З огляду на зазначене, потребують поглибленого вивчення механізми формування адаптивної відповіді клітин водоростей за рахунок окремих метаболітів, закономірності регулювання біосинтетичних процесів та участі в цих процесах іонів мікроелементів. Це дасть можливість шляхом підбору оптимальних концентрацій молей металів і неметалів у середовищі вирощування регулювати життєздатність клітин та отримувати корисні біологічно активні продукти з водоростей в умовах аквакультури.

Chlorella vulgaris відома як традиційний модельний об'єкт вивчення біохімії одноклітинних водоростей та класичний об'єкт біотехнології отримання корисних продуктів: білків, ліпідів, каротиноїдів, вітамінів, тощо [4].

Водорості, зокрема і хлорела, активно поглинають речовини проти градієнту концентрації із середовища існування. Завдяки цим властивостям мікрowodорості здатні накопичувати мікроелементи в кількостях, які в рази перевищують їх вміст у воді. Асимільовані ними з води неорганічні сполуки металів та неметалів включаються до складу вільних амінокислот, білків, езимів, полісахаридів, ліпідів і пігментів, регулюючи та модифікуючи таким чином метаболічні процеси у клітинах [2, 4, 36, 39, 43].

Селен, як для рослинних, так і для тваринних організмів, є есенціальним мікроелементом і безпосередньо бере участь у метаболічних, біофізичних та енергетичних процесах. Селенові сполуки здатні також регулювати біосинтез поліненасичених жирних кислот, каротиноїдів та пігментів [43], впливаючи у такий спосіб на фотосинтез та енергетичний обмін. Крім того, селен є одним з найбільш важливих мікроелементів і компонентом антиоксидантної системи, що забезпечує функціонування глутатіонпероксидази – одного з ключових антиоксидантних ензимів, які запобігають накопиченню вільних радикалів [1, 15, 16, 23, 41].

Щодо хрому, то питання його есенційності для рослин, включно водоростей, є досить суперечливим. Так, згідно з даними [20, 22, 40, 42] хром є токсичним і призводить до значних метаболічних порушень, насамперед оксидативного стресу. Інші автори, стверджують, що у відповідних концентраціях хром суттєвого негативного впливу на життєдіяльність водоростей не здійснює, тому використання альгоугрупвань та водних рослин у фіторемераційних заходах та біотехнології є перспективним [17, 24, 26, 32, 38]. Однак, для тварин і людини ключова роль хрому полягає в регуляції вуглеводного метаболізму, оскільки Cr(III) є компонентом фактора толерантності до глюкози [10, 14], а також бере участь у нормалізації роботи серцево-судинної системи, підвищує імунітет, збільшує тривалість та якість життя хворих з ЦД [5, 25].

Поглинання як селену, так і хрому, водоростями та його токсичність суттєво змінюються залежно від морфо-функціональних особливостей окремих видів водоростей, концентрацій і ступеня окислення мікроелементів, фізико-хімічних чинників водного середовища. Тому аналіз літературних даних показав, що оптимальним вибором для дослідження буде селен (IV) та хром (III).

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на мікропопуляціях альгологічно чистої культури зеленої прісноводної водорості *Chlorella vulgaris* Beij. Культуру водоростей вирощували в умовах накопичувальної культури на середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горхема №11 при температурі 22–25°C та освітленні лампами денного світла (інтенсивність 2500 лк) протягом 16 годин на добу [9].

В експериментальних умовах в культуральне середовище водоростей додавали водний розчин натрію селеніту з розрахунку 10,0 мг Se (IV)/дм³ та водний розчин хрому хлориду з розрахунку 5,0 мг Cr (III)/дм³. Біомасу живих клітин відбирали після 7-ми діб дії. Контролем була культура водоростей, яку вирощували без додаткового внесення сполук селену та іонів хрому.

Вміст пігментів визначали спектрофотометрично. Екстракцію проводили 90% розчином ацетону. Інтенсивність забарвлення витяжки вимірювали спектрофотометрично за довжин хвиль, що відповідають максимумам поглинання каротиноїдів та хлорофілів *a* і *b*, розрахунки проводили згідно методики [9].

Для вивчення активності ензимів енергетичного метаболізму клітини *Ch. vulgaris* відділяли від середовища з допомогою мембранних фільтрів «Synrog» з діаметром пор 0,4 мкм та готували гомогенати їх біомаси в охолоджену буферну розчину (0,066 М K⁺-Na⁺ фосфатний буфер, pH=7.4), що містив 0,5 М сахарози, 0,005 М EDTA, 0,01 М KCl, and 0,001 М MgCl, у співвідношенні 1:5 (сиря маса:буфер) [10].

Сукцинатдегідрогеназу (СДГ, КФ 1.3.99.1) визначали фероціанатним методом, який базується на окисненні сукцинату до фумарату фероціанатом калію під дією цього ензиму. Спектрофотометрію здійснювали при довжині хвилі 420 нм. Ензимну активність виражали в нмоль сукцинату/мг білка·хв. [10].

Цитохромоксидазу (ЦО, КФ 1.9.3.1) визначали методом Штрауса за конденсацією α -нафтолу і парафенілен-діамінгідрохлориду з утворенням індофенолу синього [34]. Кінцеві вимірювання здійснювали на СФ при довжині хвилі 540 нм. Результати виражали в мкг індофенолу синього/мг білка за 20 хв.

Глутаматдегідрогеназа (ГДГ, КФ 1.4.1.2) визначалася спектрофотометрично ($\lambda = 340$ нм) за швидкістю окиснення НАДН або НАДФН. Ензимну активність виражали в мкмоль НАДН (НАДФН)/мг білку·хв. [13].

Активність каталази (КТ, КФ 1.11.1.6.) визначали за методом [6], який базується на здатності гідрогенпероксиду утворювати з амоній молібдатом стійкий забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення вимірювали при 410 нм. Активність каталази виражали в каталах.

Активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) визначали за рівнем інгібування ензимом відновлення нітротетразолію синього за участі НАДН і феназинметасульфату [18]. Активність ензиму встановлювали за його здатністю інгібувати відновлення нітротетразолію синього і виражали в умовних одиницях.

Активність глутатіонпероксидази (ГПО, КФ 1.11.1.9) визначали за методом [11]. В основі розвитку кольорової реакції лежить взаємодія SH-груп з реактивом Елмана з утворенням забарвленого продукту – тіонітрофенільного аніону. Оптичну щільність виміряли на СФ при довжині хвилі 412 нм.

Вміст білків визначали за методом Лоурі і співавт. [27].

Статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою пакету прикладних програм Statistica 5.5 та Microsoft Office Excel 2007.

Результати досліджень та їх обговорення

Фотосинтетичний апарат клітини водоростей зазнає структурно-функціональних змін, насамперед, за дії стресових чинників зовнішнього середовища [12, 19, 35]. Особливий інтерес для вивчення цього процесу становить адаптивна роль фотосинтетичних пігментів – хлорофілів *a* і *b* та каротиноїдів, вміст яких нами досліджено за дії солей селену та хрому (III) (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст пігментів у клітинах *Ch. vulgaris* за дії Se (IV) 10,0 мг/дм³ та Cr (III) 5,0 мг/дм³, 7 діб, $M \pm m$, n=5

Досліджувані показники	Контроль	Se (IV)	Se (IV) + Cr (III)
Хлорофіл <i>a</i> , мкг/дм ³	142,22±19,03	193,13±12,18	176,06±9,61*
Хлорофіл <i>b</i> , мкг/дм ³	60,59±5,20	90,11±9,70	94,73±4,50*
Каротиноїди, мкг SPU/ дм ³	46,41±6,50	64,03±4,04	58,20±2,46*
Хл <i>a</i> /хл <i>b</i>	2,35±0,02	2,14±0,01*	1,86±0,02
Пігментний індекс (сума каротиноїдів/хлорофіл <i>a</i>)	0,32±0,01	0,33±0,01	0,34±0,02*

Так, за дії селеніту на 7-му добу культивування кількість хлорофілу *a* збільшилася на 36%, а каротиноїдів – на 40% порівняно з показниками в контролі. За спільної дії натрію селеніту і хрому (III) хлориду на клітини водоростей показники кількості досліджуваних пігментів теж були вищими, ніж в контрольні, однак меншими за значення, отриманні за дії селену окремо. Кількість хлорофілу *a* і каротиноїдів за дії натрію селеніту і хрому (III) хлориду у *Ch. vulgaris* була відповідно на 24% і 25% вищою, ніж в контролі, але на 9% і 10% нижчою, ніж за дії селену окремо. Щодо хлорофілу *b*, то його кількість виявилася вищою порівняно з контрольними значеннями в обох варіантах досліджу: за дії селеніту значення показника вмісту пігменту було більшим на 50%, а за спільної дії натрію селеніту і хрому (III) хлориду – більшим на 56%.

Слід зазначити, що, незважаючи на тенденцію до збільшення загального вмісту фотосинтетичних пігментів у клітинах *Ch. vulgaris*, показник співвідношення хлорофілів *a/b* зменшився порівняно з контролем за дії селеніту на 10%, а за спільної дії натрію селеніту і

хрому (III) хлориду – на 21%. Щодо пігментного індексу, то його показник був близьким до контрольних значень: більшим лише на 3% за дії селеніту та на 6% за спільної дії натрію селеніту і хрому (III) хлориду.

Співвідношення хлорофілів *a/b* у *Ch. vulgaris* характеризує потенційну фотохімічну і біосинтетичну активність клітин. За стресових впливів (дія натрію селеніту і хрому (III) хлориду) відбувається менш інтенсивне зростання кількості хлорофілу *a* або зменшення його вмісту, як менш стійкого, порівняно з хлорофілом *b*, а тому співвідношення між цими обома формами пігменту зменшується. При цьому пігментний індекс зростає за рахунок посиленого утворення каротиноїдів, які виконують як допоміжну, так і захисну функцію у процесі фотосинтезу [19, 28, 32].

Слід зазначити, що зміни вмісту хлорофілів можуть прямо залежати від змін кількості каротиноїдів. Останні своїм антиоксидантним та протекторним властивостям, беруть участь у захисті фотосинтетичних мембран від фотоокислення та знешкодження пероксидних радикалів, які, як відомо, активно утворюються за дії сполук хрому [31, 40]. Ці зміни запобігають окисненню ліпідів мембран хлоропластів та руйнуванню хлорофілу [21, 32, 38], що, відповідно, сприяє збільшенню вмісту зелених пігментів у клітинах водорості.

Стратегію успішного формування адаптацій у зміненому середовищі забезпечує, передусім, ефективне функціонування енергетичних систем клітин водоростей [19, 29]. Регуляторними ензимами, що здійснюють ланцюг перетворень енергетичних субстратів, є ензим циклу трикарбонових кислот – сукцинатдегідрогеназа та ензим електронно-транспортного ланцюга – цитохромоксидаза (рис. 1). Важливу регуляторну функцію в енергетичному обміні також відіграє глутаматдегідрогеназа – ензим нітрогенового обміну, що може здійснювати субстратне регулювання ЦТК за рахунок дезамінування глутамату з утворенням 2-оксоглутарату або навпаки. Як відновники у глутаматдегідрогеназній реакції використовуються НАДН (дезамінування глутамату) або НАДФН (амінування 2-оксоглутарату) [3, 7, 19].

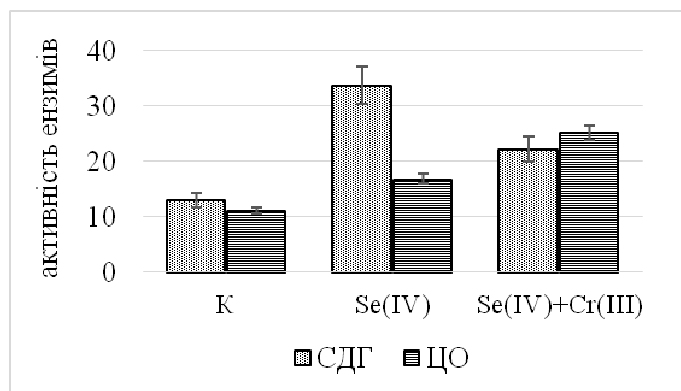


Рис. 1. Активність ензимів енергетичного обміну у клітинах *Ch. vulgaris*: СДГ (нмоль сукцинату/мг білку·хв) та ЦО (10^{-1} ·мкг індофенолу синього/мг білку·20 хв) за дії Se (IV) 10,0 мг/дм³ та Cr (III) 5,0 мг/ дм³, 7 діб, $M \pm m$, n=5

Загалом, як дія селеніту окремо, так і натрію селеніту і хрому (III) хлориду, зумовлювала зростання активності обох ензимів. Так, на 7-му добу експозиції за дії Se (IV) сукцинатдегідрогеназна активність у водоростевих клітинах збільшилася у 2,5 раза та за дії Se (IV) і Cr (III) – в 1,7 раза щодо контролю. Цитохромоксидазна активність клітин *Ch. vulgaris* також була вищою порівняно з контрольними показниками: за дії селеніту окремо – в 1,5 раза, а за спільної дії натрію селеніту і хрому (III) хлориду – у 2,2 раза.

Щодо глутаматдегідрогеназної активності, то дія солей досліджуваних мікроелементів загалом мала інгібуючий ефект на ензиматичну активність (табл. 2).

Таблиця 2

Глутаматдегідрогеназна активність клітин *Ch. vulgaris* за дії Se (IV) 10,0 мг/дм³ та Cr (III) 5,0 мг/дм³, 7 діб, M±m, n=5

	Контроль	Se (IV)	Se (IV) + Cr (III)
НАДН-ГДГ, мкмоль · 10 ⁻³ НАДН /мг білку · хв.	8,93±0,66	4,56±1,10*	6,20±0,38*
НАДФН-ГДГ, мкмоль · 10 ⁻³ НАДФН/ мг білку · хв.	11,85±0,75	9,84±1,03	9,10±0,45*
НАДН-ГДГ/НАДФН-ГДГ	0,75	0,46	0,68

Так, порівняно з контролем за впливу Se (IV) окремо активність катаболічної реакції ГДГ у клітинах хлорели зменшилася на 48%, тоді як за спільного впливу Se (IV) і Cr (III) – зменшилася на 30% відповідно. Щодо анаболічної ланки ГДГ, то зміни були менш суттєвими: за дії селеніту активність ензиму у водорості зменшилася на 17%, а за дії натрію селеніту і хрому (III) хлориду – на 23% відповідно до контрольних показників.

Співвідношення НАДН-ГДГ/НАДФН-ГДГ, яке вказує на спрямованість глутаматдегідрогеназної реакції, показує перевагу амінування глутамату над його дезамінуванням за дії досліджуваних мікроелементів, що може свідчити про використання глутамату у *Ch. vulgaris* для біосинтезу адаптивних форм метаболітів [3, 29, 36]. Окрім цього, зазначимо, що є схожість хімічних властивостей селену та сульфуру, внаслідок чого вони здатні заміщувати один одного у сполуках. При цьому, Se (IV) може бути як синергістом, так і антагоністом сульфуру. Ймовірне заміщення в дихальному ланцюгу сульфуру на селен в ферум-сульфурних центрах (Fe-S) могло активувати ензим дихального ланцюга – цитохромоксидазу (див. рис 1.), збільшуючи таким чином кількість АТФ, та ініціюючи алостеричне інгібування ГДГ у клітинах *Ch. vulgaris* [7, 29]. Щодо суттєвого збільшення сукцинат-дегідрогеназної активності, то встановлено, що СДГ володіє високим каталітичним потенціалом, який може бути реалізований при різних фізіологічних станах організму. Ензим бере участь у здійсненні регуляції і взаємозв'язку окремих шляхів не тільки окислювального, але й пластичного обмінів [10, 19]. Тому, підвищення сукцинатдегідрогеназної активності, скоріш за все, є компенсаторною реакцією енергетичного обміну до підвищених концентрацій селеніту та іонів хрому у середовищі та узгоджується з підвищенням активності цитохрооксидазної ланки ЕТЛ.

Поглинання неорганічних сполук клітинами водоростей часто супроводжується зміною окисдативного статусу клітин, що, насамперед, виражається у зміщенні рівноваги між прооксидантними процесами та активністю антиоксидантної системи [28, 41]. Se(IV) є одним з найбільш важливих мікроелементів і компонентом антиоксидантної системи всіх організмів, бере безпосередню участь у перетворенні метіоніну в цистеїн і в синтезі глутатіону, що сприяє збільшенню антиоксидантного потенціалу клітин [1, 33, 39], а Cr (III) здебільшого має яскраво виражені прооксидантні властивості [20, 24, 32]. Тому актуальним було дослідити активність антиоксидантних ензимів – каталази, глутатіонпероксидази і супероксиддисмутази (табл. 3).

Таблиця 3

Активність антиоксидантних ензимів у клітинах *Ch. vulgaris* за дії Se (IV) 10,0 мг/дм³ та Cr (III) 5,0 мг/дм³, 7 діб, M±m, n=5

	Контроль	Se (IV)	Se (IV) + Cr (III)
Каталаза, мкмоль · Н ₂ О ₂ /мг білка · хв.	1,08±0,08	0,47±0,02*	5,72±0,11*
Глутатіонпероксидаза, мкмоль GSH/100мг білка · хв	2,29±0,02	36,89±0,08*	3,65±0,13*
Супероксиддисмутаза, у.од./мг білка	10,43±0,05	13,81±0,08	18,65±0,16*

Внесення в середовище Se (IV) стимулювало збільшення активності ГПО у клітинах хлорели майже у 16 разів порівняно з контролем. При цьому зниження активності каталази у 2 рази та підвищення активності супероксиддисмутази в 1,3 рази свідчить про очевидну активізацію антиоксидантного захисту в клітинах *Ch. vulgaris* за участі селену.

Спільна дія Se (IV) і Cr (III) зумовила дещо інший, порівняно з дією селеніту окремо, ефект на функціонування зазначених ензимів. Так, активність каталази збільшилася у 5,0 разів, активність супероксиддисмутази – в 1,8 рази щодо контролю. Зазначимо, що активність глутатіонпероксидази у клітинах водорості теж збільшилася в 1,6 рази порівняно з контрольними значеннями, однак зменшилася майже у 10,0 разів порівняно з показниками, отриманими за дії селеніту окремо, що свідчить про спрямування метаболізму на знешкодження прооксидантних продуктів.

Отримані дані можна пов'язати як з включенням мікроелементів до складу ензимів, так і їх регуляторною роллю у загальному обміні речовин клітин загалом. Зокрема, ГПО є селенопротеїном або селеноглікопротеїном, до складу активного центру якого входить селен у вигляді Se-цистеїну [16, 37]. Тому підвищені кількості селеніту можуть сприяти біосинтезу та активації ГПО.

СОД і КТ в більшості випадків діють одночасно та інактивують активні форми кисню, які утворюються як в процесі нормальної життєдіяльності, так і при стресових станах. В нашому експерименті спостерігаємо, що за дії селену окремо на фоні суттєвої активності ГПО і СОД, активність КТ знижується, тоді як за спільної дії селену та хрому основну компенсаторну функцію відіграє КТ разом із СОД. Подібна протекторна гіперактивність КТ і СОД за дії хрому спостерігалася і у дослідженнях [32], коли підвищені концентрації хрому використовувалися для активізації біосинтезу з метою отримання біологічно активних сполук.

При цьому, роль каталази і глутатіонпероксидази в клітині при відновленні H_2O_2 приблизно однакова, але в цілому активність глутатіонпероксидази значно важливіше, бо її спорідненість до H_2O_2 є вищою [29]. Тому ГПО, ймовірно, відіграє визначальну роль у антиоксидантному захисті клітин як селен-залежний ензим. Активність СОД, яка чинить протилежну ГПО дію, свідчила, що менші кількості супероксиданіонів були вироблені в клітинах завдяки високій активності ГПО. Припускаємо, що підвищення активності ГПО, яка є акцептором H_2O_2 і гідропероксидів, призвело до зниження утворення супероксид радикалів через динамічне перетворення різних форм кисню [23]. Це підтверджує, що збільшення вмісту селену сприяло підвищенню активності ГПО і за рахунок зменшення вмісту продукovanого пероксиду гідрогену та супероксидних радикалів знижувалася потреба в їх поглинанні – СОД.

Отже, в адаптивній перебудові антиоксидантного статусу клітин хлорели за дії селеніту окремо провідною є роль глутатіонпероксидази, тоді як спільно з йонами хрому підвищується участь каталази та супероксиддисмутази.

Слід зазначити, що у деяких роботах відзначено позитивний захисний вплив селену за додаткового впливу сполук токсичних металів, включно хрому і ртуті [30]. Очевидно, у нашому випадку теж має місце послаблення негативного інгібуючого впливу хрому за дії селеніту.

Висновки

Біологічний ефект дії сполук селену та хрому виявлявся в активізації пігментних систем в цілому, але при цьому мало місце збільшення відносної кількості хлорофілу *b*, як більш стійкого до чинників навколишнього середовища, що, відповідно, позначилося на збільшенні співвідношення хл. *a*/хл. *b*. Також спостерігалася зростання кількості каротиноїдів, які, окрім фотосинтетичної функції, беруть участь у забезпеченні неензимного шляху антиоксидантного захисту. Для натрію селеніту і хрому, можна припустити, мала подвійний вплив на фотосинтетичний апарат *Ch. vulgaris*: безпосередній – на вміст пігментів та регуляцію швидкості електронного транспорту і опосередкований – через вплив на інші ензимні системи.

Зміни у функціонуванні фотосинтетичного апарату *Ch. vulgaris* відбивалися на всьому комплексі метаболічних перетворень, зокрема і на енергозабезпеченні клітини. Селеніт натрію окремо та за спільної дії з хромом стимулювали енергетичні ланки метаболізму хлорели шляхом активування цитохромоксидази та сукцинатдегідрогенази, однак пригнічували

активність як НАДН-, так і НАДФН-глутаматдегідрогеназ. Зміна співвідношення НАД-ГДГ/НАДФ-ГДГ на користь амінування глутамату над його дезамінуванням за дії досліджуваних мікроелементів, свідчить про можливе використання глутамату у *Ch. vulgaris* у біосинтезі адаптивних метаболітів.

Виявлено, що за дії селеніту окремо в адаптивній перебудові антиоксидантного статусу клітин хлорели провідною є роль глутатіонпероксидази, тоді як спільно з іонами хрому суттєво підвищується участь каталази та супероксиддисмутази.

Загалом, дія селеніту (10,0 мгSe (IV)/дм³) та хрому (5,0 мгCr (III)/дм³) упродовж 7 діб модифікувала метаболізм клітин хлорели через активацію фотосинтетичних пігментних систем та адаптивні перебудови енергетичного обміну та антиоксидантного захисту, які забезпечували адекватний фізіолого-біохімічний стан клітин водорості за їх дії.

Отже, підібрані концентрації досліджуваних мікроелементів, не зважаючи на їх токсичну природу, дають змогу зберегти фотохімічну життєздатність та метаболічну активність хлорели, не спричиняючи загибелі клітин водорості.

Отриманий ефект розглядаємо як підставу для розробки технологій отримання біологічно активних препаратів з культури *Ch. vulgaris*, збагачених селеном і хромом.

1. Барабой В. А. Селен: биологическая роль и антиоксидантная активность / В.А. Барабой, Е.Н. Шестакова // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 1. — С. 23—32.
2. Вінарська Г.Б. Зв'язування селену *Chlorella vulgaris* у культурі / Г.Б. Вінарська, О.І. Боднар, А.В. Станіславчук, В.В. Грубінко // — Ukr. Biochem. J. — 2014. — Vol. 86, № 5 (Suppl. 2). — P. 50—51.
3. Грубінко В.В. Функціонування ГДГ шляху зв'язування амонію у прісноводних водоростей / В.В. Грубінко, О.І. Боднар, О.В. Василенко, А.І. Луців, Г.Б. Вінарська // Наук. записки ТНПУ ім. В. Гнатюка. Серія: Біологія. Спецвип.: «Біологічна фіксація азоту». — 2014. — № 3 (60). — С. 31 — 37.
4. Золотарьова О. К. Перспективи використання мікрowodоростей у біотехнології / О.К. Золотарьова, Є. І. Шнюкова. — Київ : Альтерпрес, 2008. — 234 с.
5. Іскра Р. Я. Біохімічні механізми дії хрому в організмі людини і тварин / Р.Я. Іскра, В.Г. Янович // Укр. біохім. журн. — 2011. — 83 (5). — С. 5 — 11.
6. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк // Лаб. дело. — 1988. — №1. — С. 16—19.
7. Кретович В. Л. Усвоение и метаболизм азота в растениях / В. Л. Кретович. — М. : Наука, 1987. — 486 с.
8. Мерецький В. Сучасні погляди на роль мікроелементів у патогенезі цукрового діабету / В. Мерецький, В. Шманько // Ліки України. — 2009. — № 3. — С. 32— 35.
9. Методи гідробіологічних досліджень поверхневих вод / За ред. В.Д. Романенка. — НАН України. Ін-т гідробіології. — К.: ЛОГОС, 2006. — 408 с.
10. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) : учебное пособие / Под ред. М.И. Прохоровой. — Л.: ЛГУ, 1982. — 273 с.
11. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатион-пероксидазы в эритроцитах / В.М. Моин // Лаб. дело. — 1986. — № 12. — С. 724—727.
12. Полищук А.В. Влияние ионов ТМ на перенос электронов на акцепторной стороне фотосистемы II / А.В. Полищук, Н.Н. Топчий, К.М. Сытник // Доп. НАН України. — 2009. — № 6. — С. 203—210.
13. Софьин А.В. Глутаматдегидрогеназы одноклеточной зеленой водоросли *Ankistrodesmus braunii*. Кинетические свойства / А.В. Софьин, В.Р. Шатилов, В.Л. Кретович // Биохимия. — 1984. — Т. 49, № 2. — С. 334—343.
14. Тронько М. Д. Мікроелементи в ендокринології / М. Д. Тронько, О. В. Щербак // Аспекти фармакології. — 2009. — № 10. — С. 1—6.
15. Abd El.B.; El-Baroty G.S. Healthy Benefit of Microalgal Bioactive Substances // Journal of Aquatic Science. — 2013. — 1 (1). — P. 11— 3.
16. Antioxidant enzyme / Ed. Mohammed Amr El-Missiry. — Rijeka, Croatia : Published by InTech, 2012. — 400 p.
17. Arbab A., Zahir Sh., Removal of heavy metals (Cr, Cd, Ni and Pb) using fresh water algae (*Utricularia tenuissima*, *Utricularia tenuis* & *Zygonium ericetorum*) from contaminated water // JBES. — 2015. — Vol. 6, N 5. — P. 358—366.
18. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal Biochem. — 1971. — N 44. — P. 276—87.

19. *Buchanam B. B.* Biochemistry and Molecular Biology of Plants / B. B. Buchanam, W. Guissem, R. L. Jones. — Willey, 2015. — 1283 p.
20. *Cervantes C., Campos-Garc J., Devars S., et al.* Interactions of chromium with micro-organisms and plants // FEMS Microbiology Reviews. — 2001. — N 25. — P. 335—347.
21. *Demmig A.* Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin // Biochim Biophys Acta. — 1990. — Vol.1020. — P. 1—24.
22. *Dixit V., Pandey V., Shyam R.,* Chromium ions inactivate electron transport and enhance superoxide generation in vivo in pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) root mitochondria // Plant Cell and Environment. — 2002. — Vol. 25 (5). — P. 687—693.
23. *Hartikainen H., Xue T., Piironen V.* Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass // Plant Soil. — 2000. — Vol. 225, Issue 1—2. — P. 193—200.
24. *Jayashree S., Thangaraju N., Gnanadoss J.J.* Toxic effects of chromium on the aquatic cyanobacterium *Oscillatoria sp.* and removal of chromium by biosorption // Journal of Experimental Sciences. — 2012. — Vol. 3(5). — P. 28—34.
25. *Jeejeebhoy K. N.* Chromium and parenteral nutrition // J. Trace Elem. Exp. Med. — 1999. — Vol. 12. — P. 85—89.
26. *Kovacik J., Babula P., Hedbavny J., et al.* Physiology and methodology of chromium toxicity using alga *Scenedesmus quadricauda* as model object // Chemosphere. — 2015. — Vol. 120. — P. 23—30.
27. *Lowry O.H., Rosenbroug N.I., Farr A.L., Randall R.I.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, № 1. — P. 265—275.
28. *Mane P., Kadam D., Bhosle A.* Biochemical responses of chromium to some freshwater algal species: A laboratory study // International Journal of Current Research. — 2013. — Vol. 5, Issue 3. — P. 419—423.
29. *Metzler D.E.* Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells. / The 2nd ed. — New York—London : Academic Press, 2003. — 1973 p.
30. *Moreno F.* Antagonistic interaction of selenomethionine enantiomers on methylmercury toxicity in the microalgae *Chlorella sorokiniana* // Metallomics. — 2014. — Vol. 6. — P. 347—355.
31. *Panda S.K., Choudhury S.* Chromium stress in plants // Braz. J. Plant Physiol. — 2005. — Vol. 17. — P. 95—102.
32. *Rai V., Vajpayee P., Singh S.N., et al.* Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. // Plant Science. — 2004. — Vol. 167. — P. 1159—1169.
33. *Selenium* // Alternative Medicine Review. — 2003. — Vol. 8, N. 1. — P. 63—71.
34. *Straus W.* Colometric microdetermination of cytochrome c oxidase // J. Biol. Chem. — 1954. — Vol. 207, N 2. — P. 733—743.
35. *Sun X., Zhong Y., Huang Z., et al.* Selenium accumulation in unicellular green algae *Chlorella vulgaris* and its effects on antioxidant enzymes and content of photosynthetic pigments // PLoS ONE — 2014. — Vol. 9, N. 11. — P. 1—8.
36. *Vinyarskaya G., Bodnar O., Vasylenko O., Stanislavchuk G.* Accumulation and effects of selenium and zinc on *Chlorella vulgaris* Beij. (Chlorophyta) metabolism // Heavy Metals and Other Pollutants in the Environment. *Biological Aspects* / by ed. G.E. Zaikov. — Apple Academic Press, 2017. — P. 293—315.
37. *Vitova M., Bisova K., Doucha J., et al.* Beneficial or toxic effects of selenium on green algae and their application as nutrient supplements or bioremediators // Algal Biorefineries. — Springer International Publishing — Switzerland, 2015. — P. 315—339.
38. *Volland S., Lutz C., Michalke B., et al.* Intracellular chromium localization and cell physiological response in the unicellular alga *Micrasterias* // Aquatic Toxicology. — 2012. — Vol. 109. — P. 59—69.
39. *Whanger P. D.* Selenocompounds in plants and animals and their biological significance // J. Amer. College Nutr. — 2002. — Vol. 21, N. 3. — P. 223—232.
40. *Wong P.T., Trevors, J.T.* Chromium toxicity to algae and bacteria. // In: Chromium in the Natural and Human Environments / Eds. Nriagu, J.O., Nieboer, E., — Wiley, New York, 1988. — P. 305—315.
41. *Yamaoka Y., Takimura O., Fuse H.* Biosynthesis of glutathione and environmental factors relating to selenium accumulation by algae // Program of the First International Marine Biotech. — Tokyo, 1989. — P. 63.
42. *Yu X-Z, Feng X-H.* Effects of trivalent chromium on biomass growth, water use efficiency and distribution of nutrient elements in rice seedlings // Applied Environmental Biotechnology. — 2016. — Vol.1 (1). — P. 64—70.
43. *Zhou Z., Li P., Liu Z., et al.* Study on the accumulation of selenium and its binding to the proteins, polysaccharides and lipids from *Spirulina maxima*, *S. platensis* and *S. subsalsa* // Oceanol. Limnol. Sin. — 1997. — Vol. 28, № 4. — P. 363—370.

О. И. Боднар, Г. Б. Ковальская, О. А. Смалюк, Л. А. Онуфрийчук, В. Б. Войтюк
Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка

ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА В *CHLORELLA VULGARIS* Beij (CHLOROPHYTA)
ПРИ ДЕЙСТВИИ СОЕДИНЕНИЙ ХРОМА И СЕЛЕНА

Биологический эффект селенита ($10,0 \text{ mgSe (IV)/dm}^3$) и хрома ($5,0 \text{ mgCr (III)/dm}^3$) проявлялся в активизации пигментных систем в целом. При этом имело место увеличение относительного количества хлорофилла *b*. Также наблюдалось увеличение количества каротиноидов, которые, кроме фотосинтетической функции, участвуют в обеспечении неферментной части антиоксидантной защиты. Изменения в функционировании фотосинтетического аппарата *Ch. vulgaris* отражались на всем комплексе метаболических процессов, в том числе и на энергообеспечении клетки. Селенит натрия отдельно и при совместном действии с хлоридом хрома Cr (III) стимулировали энергетические звенья метаболизма у хлореллы путем активации цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы, однако подавляли активность как НАДН-, так и НАДФН-глутаматдегидрогеназы. Выявлено, что при действии селенита отдельно в адаптивной перестройке антиоксидантного статуса клеток хлореллы ведущую роль играет глутатионпероксидаза, тогда как совместно с ионами Cr (III) существенно повышается роль каталазы и супероксиддисмутазы.

Таким образом, подобранные концентрации исследуемых микроэлементов, несмотря на их токсическую природу, позволяют сохранить фотохимическую и метаболическую активность хлореллы, не вызывая гибели клеток водоросли. Полученный эффект рассматриваем как предпосылку для разработки технологий получения биологически активных препаратов из культуры *Ch. vulgaris*, обогащенных селеном и хромом.

Ключевые слова: водоросли, селенит, хром (III), пигменты, энергетические ферменты, антиоксидантная система

О. I. Bodnar, G. B. Koval'ska, O. A. Smaluyk, L. A. Onufriychuk, V. B. Voitiuk
Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine

CHANGES IN METABOLISM IN *CHLORELLA VULGARIS* BEIJ (CHLOROPHYTA) UNDER
THE INFLUENCE OF CHROME AND SELENIUM

The biological effect of selenium and chromium was manifested in the activation of pigment systems in general, but there was an increase in the relative amount of chlorophyll *b* as more resistant to environmental factors. Therefore, this affected in the increase in the ratio of chlorophyll *a/b*. There was also increase in the number of carotenoids, which involved in the photosynthesis and in the provision of a non-enzymatic way of antioxidant protection.

We suggest that the effect of selenium and chromium ions have a double impact on the photosynthetic apparatus of *Ch. vulgaris*. This is a direct impact on the content of pigments and the regulation of the speed of electronic transport and indirect effects due to effects on other enzyme systems.

Changes in the functioning of the photosynthetic apparatus *Ch. vulgaris* were reflected in the whole complex of metabolic transformations, in particular, on energy supply of the cell. Sodium selenite separately and together with chromium stimulated the energy bonds of chlorella's metabolism by activating cytochrome *c* oxidase and succinate dehydrogenase, but inhibited the activity of NADH- and NADPH-glutamate hydrogenases. Changing the ratio of NAD-GDG / NADP-GDH in favor of amination glutamate over its deamination under the action of these trace elements, indicates about the possible use of glutamate, as amino acid, in the cells *Ch. vulgaris* as an additional energy substrate.

It was founded that under the action of selenite separately the leading role in adaptive rearrangement of antioxidant status of chlorella cells has of glutathione peroxidase, while in combination with chromium ions significantly increase activity of catalase and superoxide dismutase significantly increase.

In general, the action of selenium (10.0 mg / dm^3) and chromium (5.0 mg / dm^3) by introducing them into the culture medium for 7 days modified the metabolism of *Ch. vulgaris* cells. We observed the activation of photosynthetic pigment systems and the adaptive reorganization of energy

metabolism and antioxidant protection, which provided an adequate physiological and biochemical state of algae cells under their action.

Therefore, the selected concentrations of the investigated microelements, despite their toxic nature, make it possible to preserve the photochemical viability and metabolic activity of chlorella without causing the death of algal cells. The received effect is considered as a potential opportunity for the development of technologies for the production of biologically active preparations from culture *Ch. vulgaris*, enriched with selenium and chromium.

Key words: algae, Se (IY), Cr (III), pigments, energy enzymes, antioxidant system

Рекомендує до друку

Надійшла 13.03.2018

В. В. Грубінко

УДК (597.552.1+ 597.554.3):611.018.54:577.128:546.723

О. О. РАБЧЕНЮК

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

ВПЛИВ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ЙОНІВ Fe³⁺ У ВОДІ НА ВМІСТ ЗАЛІЗА ТА ТРАНСФЕРИНУ У ПЛАЗМІ КРОВІ РИБ

Досліджено вміст заліза, загального білка та концентрацію трансферину у плазмі крові коропа (*Suprinus carpio* L.) і щуки (*Esox lucius* L.) за дії 2 та 5 гранично допустимих рибогосподарських концентрацій (ГДК) йонів Fe³⁺ у воді. Встановлено, що підвищений вміст йонів феруму у воді призводить до зростання кількості металу у плазмі обох видів риб та збільшення показника насичення трансферину залізом. Дані показники можуть бути використані для оцінки забруднення водного середовища йонами Fe³⁺.

Ключові слова: короп, щука, кров, плазма, залізо, трансферин

Підвищення концентрації металів у водному середовищі призводить до надмірного їх акумулювання в організмі гідробіонтів, включно риб. Зростання концентрації металів у функціонально важливих органах і тканинах (у тому числі в крові) змінює процеси синтезу макромолекул, функціонування ферментативних систем та співвідношення метаболітів у всьому організмі [1, 7].

Ферум є необхідним елементом для нормальної життєдіяльності риб [6, 10]. Недостатність цього металу може бути лімітуючим чинником розвитку організму. Цей хімічний елемент, який міститься в організмі риб, поділяють на дві групи: геміновий та негеміновий. Перша група включає ферум хромопротеїдів (дихальні білки – гемоглобін, хлорокруарин, гелікорубін, білок м'язів – міоглобін), а також дихальних ферментів (цитохроми, цитохромоксидази, пероксидази, каталази). До другої групи входить ферум низки речовин, які не містять гемоферумпорфіринового комплексу (геморетрин) [5].

В процесі еволюції природа не розвинула ефективних механізмів виведення заліза з організму еукаріотів, тому оптимальна концентрація металу може підтримуватися лише за рахунок обмеження його поглинання [9].

Серед білків, що безпосередньо пов'язані із регуляцією вмісту феруму в організмі тварин, у тому числі риб, слід виділити трансферин. Трансферин, виявлений у широкому колі організмів, він зустрічається в різних генетично залежних формах, які подібні за своїми фізико-хімічними властивостями та мають молекулярну масу близько 70-80 кДа [6]. Трансферин – це складний білок (глікопротеїд) плазми крові, який відноситься до β-глобулінів і має здатність зв'язувати і переносити йони трьохвалентного заліза. Основною функцією трансферину плазми