

13. Nagavama G., Ohshima H., Umezawa K. Distribution of glucose-6-phosphate metabolizing enzymes in fish // *Nippon Suisan Gakkaishi* — 1972 — Vol 38 — P 589-593.
14. Schort F. A. Protein synthesis by red and white muscle in vitro: effect of insulin and animal age // *Am J Physiol.* — 1969 — Vol 217 N 1 — P 307-309

V.Z. Kurant, S.V. Brodin, Y.V. Synyuk

## INFLUENCE OF IONS OF HEAVY METALS ON METABOLISM OF GLYCINE IN ORGANISM OF CARP IN VIVO

The inclusion of glycine in proteins, lipids and carbohydrates under the influence of ions of manganese, zinc, copper and lead on carp organism in vivo has been studied. It is shown that the intoxication of fish organisms by the ions of heavy metals leads to the intensification of glycine metabolism in fish tissues, which proves the important role of this amino acid in the substrate supply of the energy processes.

Надійшла 12.03.2001

УДК 612.015.3:577.17:597.554.3

**Р.Б. Балабан**

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

## СТАН РІВНОВАГИ У ГЛУТАМАТДЕГІДРОГЕНАЗІЙ РЕАКЦІЇ ЗА ДІЇ ІОНІВ МАРГАНЦЮ, ЦИНКУ ТА МІДІ В ТКАНИНАХ КОРОПА

*прісноводні риби важкі метали глутаматдегідрогеназа*

Глутаматдегідрогеназа (ГДГ) — ключовий фермент біосинтезу глутамату в клітинах. У більшості організмів виявлено ГДГ двох типів, які відрізняються спорідненістю до певного кофактору NAD (H) чи NADP (H), молекулярною масою, властивостями і метаболічною роллю [7]. Напрямок глутаматдегідрогеназної реакції регулюється співвідношенням у клітинах концентрації її субстратів 2-оксиглутарату та глутамату. Зміщення рівноваги в реакції (зв'язування аміаку 2-оксиглутаратом в глутамат чи навпаки), яка каталізується одним ферментом, визначає тип коферменту [11,14]. Тому про спрямованість процесу синтезу-розщеплення глутамату судять за співвідношенням активностей ГДГ з NAD (H) та NADP (H). В організмі риб дезамінування глутамату здійснює NAD(H) залежна ГДГ [1,5,8], а його синтез - NADP (H) -залежний фермент [3,14]. При цьому обидві форми локалізовані у мітохондріях [1]. Співвідношення їх активностей регулює рівень 2-оксиглутарату, глутамату та аміаку.

У літературі існує ряд даних про зміни дегідрогеназної активності за дії різних екстремальних чинників, так, підвишена активність ГДГ спостерігалась при отруєнні плямистою змієголова сублетальними концентраціями ртуті [20], тійпті атразином і сатурном [19]. Активність ГДГ збільшується у гамбузі при токсичній дії  $\text{NaNO}_3$  (100 мг/л) або  $\text{NaNO}_2$  (0,12 мг/л) [18] і в цирках фореті при дії  $\text{NaCl}$  [16].

ГДГ здатна зміщувати рівновагу "α-кетоглутарат-глутамат" в той чи інший бік в залежності від співвідношення концентрацій NAD- і NADP в середовищі. Так, у зимуючої молоді коропа рівновага зміщена в бік NADP-залежної реакції. Вважають, що це є додатковим шляхом детоксикації аміаку, що веде до відтоку α-кетоглутарату з пулу проміжних продуктів циклу Кребса [4]. За рахунок активного функціонування глутаматдегідрогеназної системи у коропа здійснюється детоксикація надлишкового аміаку, а також забезпечується необхідним субстратом ферментна система синтезу амінів [6].

Відомі також вікові зміни активності NADP-залежних дегідрогеназ в печінці коропа [10]. Максимальний рівень активності цих ферментів у статевозрілих особин був констатований напередодні нересту. Загальною закономірністю було зниження активності усіх ферментів в печінці після гіпофізарних ін'єкцій і після нересту.

Отже, зміна активності функціонування глутаматдегідрогеназної системи забезпечує низку пристосувань як до сезонних та вікових змін в організмі, так і до негативних екологічних факторів. Метою нашого дослідження стало з'ясувати стан рівноваги у глутаматдегідрогеназній реакції в організмі коропа при дії іонів марганцю, цинку та міді.

### Матеріали і методи досліджень

Дослиди проводились на коропах (*Cyprinus carpio L.*) дворічного віку, які утримувались в акваріумах об'ємом 200 л, заповнених відстояною водопровідною водою при температурі  $14 \pm 1^\circ\text{C}$ . Гідрохімічні показники води і кисневий режим були стандартними. Вміст кисню становив 7,0-8,0 мг/л, вуглекислого газу — 2,2-2,8 мг/л. Значення рН було в межах 8,10-8,25. Вміст основних катіонів та аніонів був близьким до норми згідно вимог [13]. З метою уникнення впливу на рибу їх власних екзометаболітів воду в акваріумах міняли кожних дві доби. У процесі експерименту рибу не годували.

Вивчали вплив на рибу іонів  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  та  $\text{Cu}^{2+}$  в концентраціях 2,4 та 6 мг/л, 2 і 5 мг/л та 0,1 і 0,5 мг/л відповідно, що становить 2 і 5 рибогосподарських ГДК. Метали вносили у вигляді солей  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$  та  $\text{CuSO}_4$ .

Для досліджень брали печінку та м'язову тканину, які заморожували, розтирали і використовували для виділення субклітинних структур методом диференційного центрифугування гомогенатів, які готували в 0,22 М розчині сахарози, що містив 0,05М калій-фосфатного буферу (рН=7,5) та 0,001 М ЕДТА. Схема центрифугування була класичною для отримання мітохондрій та цитозолу клітин. Досліджували активність NADH та NAD (P) H залежних глутаматдегідрогеназ.

Активність ГДГ визначали спектрофотометрично в прямій і зворотній реакціях з використанням одного з субстратів NADH або NAD (P) H по кількості відновленого NAD (P). вимірюючи приріст оптичної густини при 340 нм в 0,05 М калій-фосфатному буфері, згідно відомого методу [15]. Інкубаційна суміш містила: 50 мМ калій-фосфатного буферу (рН=7,5), 13,6 мМ 2-оксиглутарату; 21мМ фосфату амонію, 0,9 мМ ЕДТА, 0,12 мМ NAD (P) H; 1,7мМ ADP. Ферментну активність виражали в наномоль NAD (P) H на 1 мг білку за хвилину.

Вміст білку визначали за методом Лоурі та співавторів [17]. Отримані результати піддавали статистичній обробці за загальноприйнятою методикою з використанням t-критерію Стьюдента для визначення достовірності різниці [12].

### Результати досліджень та їх обговорення

Найбільш інтенсивно синтез глутамату протікає в м'язі та печінці коропа при дії іонів марганцю (табл. 1), які, як відомо, активують низку металоферментних комплексів, зокрема глутамінсинтетазу [14]. Можна припустити спряженість функціонування цього ферменту та NADP(H)-залежної ГДГ, оскільки продуктом відновного амінування 2-оксиглутарату є глутамат.

Памітна і тканиноспецифічна для іонів важких металів (ВМ) на активність різних форм ГДГ. Якщо активність NAD (H) -залежної форми ГДГ у печінці і в м'язах має незначне відхилення від контрольних показників, то у присутності NADP (H) ГДГ-активність у м'язах значно зростає, хоча залишається більш стабільною в печінці.

Аналіз активності NAD(H) -і NADP(H)-залежних глутаматдегідрогеназ в тканинах коропа при дії іонів цинку вказує на переважання процесів синтезу глутамату в м'язах коропа як в контролі, так і в дослідних групах (табл. 2). Причому, цей процес дещо сповільнюється при концентрації іонів 2,0 мг/л, і різко зростає при концентрації 5,0 мг/л. Схожа картина спостерігалася у молоді коропа під час зимівлі, що є додатковим шляхом детоксикації аміаку і веде до відтоку  $\alpha$ -кетоглутарату з пулу проміжних продуктів циклу Кребса [4]. Протилежна тенденція має місце в печінці. Тут переважає процес розщеплення глутамату над його утворенням і лише при концентрації 5,0 мг/л активність NADP(H)-залежної ГДГ збільшується.

**Активність NADH-і NADPH-залежних глутаматдегідрогеназ в тканинах коропа при дії іонів марганцю (мкМ / мг білку / хв · 10<sup>-3</sup>)**

Групи риб	NADH-ГДГ	NADPH-ГДГ
М'язи		
контроль	21,94±2,26	127,72±19,32
2ГДК	24,12±3,84	136,92±10,82
5ГДК	12,80±2,90*	109,32±4,44
Печінка		
контроль	14,14±0,61	92,20±9,94
2ГДК	9,66±3,60	125,74±25,28
5ГДК	10,00±2,08	97,80±3,60

Примітка \* — в табл 1-3 різниця вірогідна порівняно з контролем (p<0,05)

За дії іонів міді (табл 3) в м'язах коропа відмічається також переважання синтезу глутамату над його утворенням. Активне функціонування глутаматдегідрогеназної системи у коропа здійснює детоксикацію надлишкового аміаку, а також забезпечує необхідним субстратом ферментну систему синтезу амідів [6]. Проте, рівень активності NAD (H) -залежної ГДГ в печінці вищий, ніж активність NADP (H) -залежної ГДГ як в контролі, так і у піддослідних риб, що свідчить про переважання процесу розщеплення глутамату над його утворенням таким шляхом і узгоджується з даними про високу активність саме глутаматдегідрогеназного шляху дезамінування амінокислот у риб.

Таблиця 2

**Активність NADH-і NADPH-залежних глутаматдегідрогеназ в тканинах коропа при дії іонів цинку (мкМ / мг білку / хв 10<sup>-3</sup>)**

Група риб	NADH-ГДГ	NADPH-ГДГ
М'язи		
контроль	50,54±12,52	109,69±18,98
2ГДК	42,76±3,99	64,95±8,81
5ГДК	42,76±5,79	170,09±66,05*
Печінка		
контроль	32,72±2,65	24,28±1,27
2ГДК	34,82±2,37	21,19±1,93
5ГДК	16,99±1,54*	36,36±3,09*

Таблиця 3

**Активність NADH-і NADPH-залежних глутаматдегідрогеназ в тканинах коропа при дії іонів міді (мкМ / мг білку / хв 10<sup>-3</sup>)**

Група риб	NADH-ГДГ	NADPH-ГДГ
М'язи		
контроль	51,08±11,27	70,88±4,90
2ГДК	8,72±0,69*	97,88±2,96
5ГДК	23,55±2,36	89,70±6,71
Печінка		
контроль	14,39±2,28	6,99±1,45
2ГДК	21,10±5,16*	5,52±1,59
5ГДК	9,13±1,36	5,05±0,81

Як видно із наведених даних, активність ферментів є непостійною величиною, яка змінюється під впливом різних фізичних і хімічних чинників. Ця мінливість відіграє значну і різноманітну роль в життєдіяльності організму. Зрушення активності ферментів у відповідь на зміни факторів середовища забезпечують організму можливість пристосування до нових умов існування. У випадку інтоксикації іонами важких металів, зміна ферментативної активності ГДГ свідчить про роль глутамінової системи в детоксикації аміаку у коропа. Принцип її

функціонування полягає у зв'язуванні аміаку в місцях утворення в нетоксичний глутамін, транспорті його в зябра з наступним розщепленням глутаміназою і виведення аміаку в зовнішнє середовище [2]

### Висновки

У результаті проведених досліджень встановлено, що іони марганцю, цинку та міді змінюють рівновагу в глутаматдегідрогеназній системі в м'язах в бік синтезу глутамату, а в печінці, як правило, — в бік розщеплення останнього. Можна стверджувати, що зміна рівноваги в глутаматдегідрогеназній системі є наслідком пристосувань коропа до токсичного стресу, спричиненого впливом іонів важких металів.

### ЛІТЕРАТУРА

- 1 Грубинко В. В., Яковенко Б. В., Явоненко А. Ф. Субклеточная локализация глутаминсинтетазной активности в мышечной ткани и печени карпа // Укр биохим журн — 1987 — Т. 59, № 3 — С. 73-76
- 2 Грубинко В. В. Механизм выведения аммиака у карпа, роль в нем глутаминсинтетазы и ее свойства. Автореф. дисс. канд. биол. наук 03.00.04 МГПИ им. В. И. Ленина — М., 1988 — 17 с.
- 3 Грубинко В. В. Роль глутамина в обеспечении азотистого гомеостаза у рыб (обзор) // Гидробиол. журн — 1991 — Т. 27, № 4 — С. 46-56
- 4 Грубинко В. В., Жиденко А. А., Явоненко А. Ф. Конкурентные взаимоотношения NADP-ДГ и α-кетоглутаратдегидрогеназы в митохондриях мозга зимующей молоди карпа // Экоз. энерг. животных. Всес. сов. — Суздаль, 31 окт. - 3 нояб. 1988. Газ. докл. Пущино, 1988 — С. 54-55
- 5 Грубинко В. В., Яковенко Б. В., Явоненко А. Ф. Некоторые ферментативные пути образования аммиака у карпа при голодании // Ред. «Гидробиол. журн» — Киев, 1986 — Дел. в ВИНТИИ, № 8742-В86-11 с.
- 6 Грубинко В. В. Адаптивні реакції риб до дії аміаку лодного середовища // Арт. ц.л. докт. біол. наук 03.00.18/05.00.04 Інститут гідробіології НАН України — К., 1995 — 39 с.
- 7 Диклоя М. Уэбб Э. Ферменты — М. Мир, 1982 — Г. 1 — 386 с.
- 8 Коун К. Сарджент Дж. Биол. энергетика и рост рыб — М. Мир, 1983 — С. 8-69
- 9 Лавровский С. Н. Активность ЛДГ и ее изоферментов в первой ткани на ранних сроках циркуляторной гипоксии головного мозга // Биохимия гипоксии — Горький, 1975 — С. 18-23
- 10 Малиновская М. В. Возрастные изменения активности NADP-зависимых дегидрогеназ в печени карпа // Гидробиол. журн — 1996 — Т. 32, № 3 — С. 112-113
- 11 Меншлер Д. Биохимия — М. Мир, 1980 — Г. 1 — 407 с., Г. 2 — 597 с.
- 12 Ойвин И. А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований // Патол. физиол. и эксперим. терапия — 1960 — Г. 4, № 4 — С. 76-81
- 13 Технология производства рыбы в прудовых хозяйствах СССР / Ред. Федорченко В. И., Михеева В. П. — М. ВНИИПРХ — 1986 — 161 с.
- 14 Шагилов В. Р. Глутаматдегидрогеназы / Физимология ассимиляции аммония у растений // Итоги науки и техники. Сер. биол. хим. — М. ВИНТИИ - 1987 — Т. 24 — С. 5-104
- 15 Glock G. E., McLean P. A. Preliminary investigation of the hormonal control on the hexose monophosphate oxidative pathway // Biochem. J. — 1955 - Vol. 61, № 2 — P. 390-395
- 16 Jurss K., Vittorf Th., Vokler Th., Wacke R. Influence of nutrition on biochemical sea water adaptation of the rainbow trout *Salmo gairdneri* R. // Comp. Biochem. and Physiol. — 1985 — Vol. 75, N 4 — P. 713-717
- 17 Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randell R. C. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951 — Vol. 193, N 1 — P. 265-275
- 18 Naga Raju T., Ramana Rao S. J. Vol. Levels of dehydrogenases of mosquito fish, *Gambusia affinis* (Baird & Girard) subjected to nitrate and nitrite stress // Indian J. Environ. Health — 1983 — Vol. 25, N 3 — P. 175-178
- 19 Rao K. S. P. et al. Changes in nitrogen metabolism of fish (*Sarotherodon mossambicus*) exposed to benthocarb // Bull. Environ. Contam. and Toxicol. — 1983 — Vol. 33, N 4 — P. 473-478
- 20 Sastry K. Vol., Rao D. R. Chronic effects of mercuric chloride on the activities of some enzymes in certain tissues of the fresh water murrel, *Channa punctatus* // Chemosphere — 1989 — Vol. 11, N 12 — P. 1203-1209

## 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 окисдаивний 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-динітрофенілгідразони [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.