

УДК 577.352.38:577.64

О.Б. Столяр, А.С. Мудра, О.Л. Клебан, С.А. Костюк

Тернопільський державний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка
46027 Тернопіль, вул. М.Кривоноса, 2**ВПЛИВ СУБЛЕТАЛЬНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ЙОНІВ ЦИНКУ НА
МЕТАБОЛІЧНУ ФУНКЦІЮ ТА ПРООКСИДАНТНО-
АНТИОКСИДАНТНИЙ СТАН ГЕПАТОПАНКРЕАСУ КОРОПА***короп, цинк, гепатопанкреас, глутатіон, γ -глутамілтранспептидаза, лужна фосфатаза, ферменти антиоксидантного захисту, продукти перекисного окиснення ліпідів*

Йони цинку відіграють суттєву роль у функціонуванні клітин гепатопанкреасу. Вони є кофакторами багатьох ферментів, в тому числі біосинтезу білків, антиоксидантного захисту, стабілізують просторову структуру нуклеїнових кислот та білків [17]. Тому цинк використовується як стимулятор біосинтетичних процесів в організмі сільськогосподарських тварин [1, 12]. Вивчення можливостей його використання у рибництві та забруднення прісних водойм сполуками цинку роблять актуальним вивчення діапазону стимулюючих і токсичних концентрацій цього металу для риб.

У зв'язку з цим метою нашої роботи було порівняти дію йонів цинку в концентраціях, які відповідають 0,1 і 2 ГДК, на метаболічну функцію гепатопанкреасу коропа.

Матеріали і методика досліджень

Дослідження проводились на коропі лускатому (*Cyprinus carpio* L.) масою 200-250 г, попередньо адаптованому до акваріальних умов. Риб утримували протягом 14 діб у басейнах об'ємом 200 л при температурі близько 18°C у відстоєній, добре аерованій воді. Воду в басейнах міняли щодобово, поновлюючи в ній вміст металу. Концентрація йонів цинку у вигляді сульфату у воді відповідала 0,1 і 2 рыбогосподарським ГДК, що становило 0,1 і 2,0 мг/л [1].

Для аналізу брали передню долю гепатопанкреасу. Всі процедури по виділенню і обробці зразків проводились на холоді. Активність каталази (К.Ф. 1.11.1.6) визначали за методом Королюка і співавт. [5]. Активність γ -глутамілтранспептидази (К.Ф. 2.3.2.2) вимірювали за здатністю ферменту переносити L- γ -глутамільний залишок з хромогенного субстрату — p-нітроаніліну на гліцил-гліцин, що супроводжується збільшенням оптичної густини розчину при довжині хвилі 400 нм [4]. Визначали також активність лужної фосфатази (К.Ф. 3.1.3.1) за здатністю ферменту каталізувати реакцію окиснення β -гліцерофосфату [4]. Активність супероксиднемутази (СОД) (К.Ф. 1.15.1.1) вимірювали за інтенсивністю відновлення пітрогетразолію [2], концентрацію відновленого глутатіону (небілкових тіолів) — за допомогою реактиву Елмана [15].

Інтенсивність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за допомогою тіобарбітурової кислоти (ТБК), як концентрацію ТБК-активних продуктів, серед яких переважає один з кінцевих продуктів ПОЛ — малоновий диальдегід (МДА) [13]. За вмістом МДА характеризували спонтанне, ферментне (НАДФН-залежне) і неферментне (Fe^{2+} -аскорбат-залежне) ПОЛ, а також стан (індекс) антиоксидантної активності гепатопанкреасу [6, 8]. Гомогенати інкубували 30 хв при 25°C: для визначення інтенсивності спонтанного ПОЛ — без додатків, для оцінки виходу МДА в неферментній системі переокиснення — з додаванням аскорбінової кислоти, — з метою визначення продукування МДА в ферментній НАДФН-залежній системі ПОЛ — з додаванням НАДФН. Інкубаційна суміш для визначення неферментного ПОЛ містила 80 мМ аскорбінової кислоти, 0,2 мМ АДФ, 0,012 мМ $FeSO_4$, а ферментного ПОЛ — замість аскорбінової кислоти — 0,5 мМ НАДФН. Визначали також вміст середньомолекулярних пептидів [9] та загальний вміст білків в гепатопанкреасі [16]. Результати обробляли статистично [11].

Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження впливу йонів цинку на метаболічну функцію гепатопанкреасу показали (табл. 1), що більшість показників в заданому діапазоні доз залишаються в межах норми. Лише загальний вміст білків в гепатопанкреасі збільшується при дії обох концентрацій цинку. Ці результати свідчать про те, що транспорт амінокислот в гепатоцити, обмін глутатіону, який відіграє важливі функції антиоксиданта, джерела цистеїну та γ -глутамільного залишку для багатьох біохімічних процесів в гепатопанкреасі [10] за дії досліджуваних доз цинку не зазнають істотних змін. Визначення активності фосфатази, як індикатора запальних процесів у гепатопанкреасі, також характеризує стан тканини як нормальний. Серед молекул середньої маси не зазнають кількісних змін ні нуклеотиди (D_{254}), ні пептиди (D_{280}) [9].

Таблиця 1

Вплив йонів цинку на деякі показники метаболізму у гепатопанкреасі коропи, $M \pm m$, $n = 5$

Показник	0,1 мг/л цинку		2,0 мг/л цинку	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
Активність γ -глутамілтрансферази, мкмоль С ₂ H ₂ білків хв	49,8±4,0	48,0±9,8	35,6±2,3	34,5±5,9
Активність лужної фосфатази, мкмоль фосфату/мі білків хв	5,73±0,39	6,69±1,20	7,07±2,02	5,68±1,39
Вміст фосфату неорг., мкг/г тканини	5,20±0,27	5,18±0,10	14,3±0,5	14,2±0,6
Вміст білків, мг/г тканини	75,0±4,7	118,5±7,6*	94,8±6,8	122,0±2,7*
Вміст молекул середньої маси (D_{280}), ум. од./г тканини	412,0±14,4	433,0±24,3	608,4±31,5	663,6±46,8
Вміст молекул середньої маси (D_{254}), ум. од./г тканини	678,2±6,8	648,2±39,1	870,4±55,5	918,0±61,7
Пітьокмолекулярні поліпептиди, мкмоль/г тканини	6,76±0,16	6,83±0,14	X	X

Примітка до табл. 1-3: * – відмінності порівняно з контролем виробіди, $p < 0,05$, X – показник не визначався

Серед досліджуваних показників прооксидантно-антиоксидантного статусу найбільш чутливим виявилась активність каталази. Активність СОД зменшується, а вміст МДА в тканині не зазнає змін порівняно з контролем в обох дослідних серіях, що узгоджується з одержаними раніше даними [14]. Однак більш детальне дослідження вмісту продуктів ПОЛ, які утворюються під час інкубації гомогенату гепатопанкреасу показало (табл. 3), що незначне збільшення вмісту цинку в тканині (доза 0,1 мг/л) істотно зменшує утворення МДА, причому за рахунок пригнічення як ферментного, так і неферментного ПОЛ.

Таблиця 2

Вплив йонів цинку на прооксидантно-антиоксидантний статус гепатопанкреасу коропи, $M \pm m$, $n = 5$

Показник	0,1 мг/л цинку		2,0 мг/л цинку	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
Активність СОД, у.о. мі білків	12,0±1,7	8,20±1,5	4,88±0,38	2,12±0,21*
Активність каталази, мкат/г білків	154±29	101±29	420±72	890±87*
Вміст МДА, мкмоль/г тканини	27,4±2,4	24,6±2,1	44,6±11,6	43,1±3,4

За дії 2,0 мг/л цинку також спостерігається зменшення інтенсивності неферментного ПОЛ, тоді як рівень спонтанного і ферментного ПОЛ не зазнає змін порівняно з контролем. В обох дослідних серіях зростає частка ферментного шляху утворення МДА відносно неферментного. Поряд з цим, індекс антиоксидантної активності за дії обох досліджуваних концентрацій цинку істотно зменшується. Якщо в нормі концентрування проби призводить до пригнічення ПОЛ в ній, то за дії цинку спостерігаються протилежні зміни [8]. Отже, показники ПОЛ є чутливими до дії цинку, але за їх вимірюванням не можна однозначно твердити про вплив цинку на ці процеси.

Утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в гепатопанкреасі коропа при дії йонів цинку залежно від умов інкубації, $M \pm m$, $n = 5$

Вміст цинку у воді, мг/л		Спонтанне ПОЛ, мкмоль/г тканини	Ферментне ПОЛ, мкмоль/г тканини	Неферментне ПОЛ, мкмоль/г тканини	Співвідношення ферментного і неферментного ПОЛ	Індекс антиоксидантної активності
0,1	Контроль	40,5±6,0	192±4	165±8	1,18±0,07	2,33±0,26
	Дослід	23,2±1,2*	160±2*	106±6*	1,56±0,11*	1,58±0,11*
2,0	Контроль	44,9±10,0	254±7	312±11	0,81±0,03	2,63±0,45
	Дослід	47,2±3,7	245±5	130±16*	1,84±0,27*	1,91±0,28*

Відомо, що цинк, який потрапляє з води в організм риб, значною мірою акумулюється в печінці і істотно впливає на метаболізм в цьому органі в перші доби інкубації. При тривалій (168 год) експозиції коропа в присутності у воді 1,0 мг/л цинку відбувається певна стабілізація як накопичення металу в печінці, так і ефективності його дії на процеси метаболізму [3]. Оскільки цинк є фізіологічно активним металом, то, очевидно, існують універсальні механізми підтримання його гомеостазу в тканині, завдяки яким його вміст, як і стан досліджуваних показників, мало змінюються при дії цього металу на організм. Результати нашого експерименту також свідчать, що функція більшості ферментів, в тому числі і цинкмісного (СОД) [2] залишається в межах норми. Очевидно цинк ініціює синтез білків гепатопанкреасу, оскільки загальний їх в тканині зростає. Зростання вмісту цинку в середовищі приводить також до активації процесів антиоксидантного захисту, в першу чергу неферментативного, що особливо помітно проявляється при дії 0,1 мг/л металу. Конкретна природа чинників цього захисту потребує подальшого вивчення.

Висновки

Дія йонів цинку в концентрації 0,1 і 2,0 мг/л на організм коропа протягом 14 діб не викликає змін метаболічної активності в гепатопанкреасі. За впливу обох досліджуваних доз відбувається збільшення активності факторів антиоксидантного неферментного захисту, особливо виражене при дії 0,1 мг/л металу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Воробьев В. И. Микроэлементы и их применение в рыбководстве — М.: Пищевая промышленность. — 1979. — 183 с.
2. Дубинина Е. Е. Активность и свойства супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека в онтогенезе // Укр биохим. журн. — 1988. — Т. 60, № 3. — С. 20-25.
3. Евтушенко Н. Ю., Романенко В. Д., Малышева Т. Д. Влияние содержания цинка в воде на обмен радиоуглерода в липидах печени карпа // Гидробиол. журн. — 1984. — Т. 20, № 3. — С. 66-69.
4. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. Минск: Беларусь, 1982. — С. 290-291.
5. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16-19.
6. Кухтина Е. Н., Глущенко Н. Н. Влияние железа, цинка, меди на процессы перекисного окисления липидов печени *in vivo* // Биохимия. — 1996. — Т. 61, № 6. — С. 993-997.
7. Леус Ю. В., Грубинко В. В. Активность антиоксидантной системы карпа при действии тяжелых металлов // Гидробиол. ж. — 1998. — № 2. — С. 59-63.
8. Маргынюк В. Б., Ковальчук С. Н., Тымочко М. Ф., Панасюк Е. П. Индекс антиокислительной активности биологического материала // Лаб дело. — 1991. — № 3. — С. 12-22
9. Нагоев Б.С., Габрилович М.И. Значение определения средних молекул в плазме крови при инфекционных заболеваниях вирусной и бактериальной этиологии // Клин. лаб. диагностика. — 2000. — № 1. — С. 9-11.
10. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Обмен глутатиона // Усп. биол. химии. М.: Наука, 1990. — Т. 31. — С. 157-179.
11. Ойвин И. А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований // Патол. физиология и экспер. терапия. — 1960. — № 4. — С. 76-85.

12. Романенко В. Д. Печень и регуляция межуточного обмена (млекопитающие и рыбы). — К.: Наук. думка. — 1978. — 184 с.
13. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С.66-68.
14. Столяр О. Б., Зінковська Н. Г., Грубінко 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.
15. Столяр О. Б., Зінковська Н. Г., Мудра А. Є., та ін. Антиоксидантно-прооксидантний статус організму коропа при дії сублетальної концентрації міді (II) // Наук. записки Тернопільського педуніверситету. Серія: Біологія. — Тернопіль. — 2000. — № 3(10). — С. 72-78.
16. Loury O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 191, № 1. — P. 265-275.
17. Radi 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. — Vol. 90C, № 1. — P. 69-72.

O. B Stolyar, A. Y. Mudra, O. L. Kleban, S. A. Kostyuk

THE INFLUENCE OF SUBLETHAL CONCENTRATIONS OF ZINC IONS ON THE METABOLICAL FUNCTION AND ANTYOXIDANT-PROOXIDANT STATUS OF CARP HEPATHOPANCREAS

The influence of exposure to 0,1 and 2,0 mg zinc ions/l for up 14 days on the activity of γ -glutamyltranspherase and phosphatase, some methabolite content and antyoxidant-prooxidant status of carp hepathopancreas has been investigated. The results show that the metabolical activity of tissue under the experimental conditions isn't change. The zinc activates the nonfermentenive compounds of antioxidante protection.

Надійшло 01.02.2001