

УДК 661.84 : 597: 577.152.1

Ю.І. СЕНИК<sup>1</sup>, І.Ю. НАЙКО<sup>2</sup>, Т.В. МАРКОВА<sup>1</sup>, О.О. ЛУЦІВ<sup>1</sup>, В.Я. БИЯК<sup>1</sup>,  
В.З. КУРАНТ<sup>1</sup><sup>1</sup>Тернопільський національний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка  
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027<sup>2</sup>ПВНЗ “Буковинський університет”  
вул. Дарвіна, 2а, Чернівці, 58000

## **ЕНЕРГОЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ТКАНИН ЗЯБЕР ТА ПЕЧІНКИ РИБ ЗА ДІЇ ЙОНІВ ЦИНКУ ТА КАДМІЮ**

Досліджено активності сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази та лактатдегідрогенази зябер і печінки коропа та щуки за дії 0,5 та 2 рибогосподарських граничнодопустимих концентрацій йонів цинку і кадмію. Дія допорогової концентрацій йонів цинку призводила до активації сукцинатдегідрогенази і цитохромоксидази та інгібування лактатдегідрогенази тканин коропа і щуки. За впливу 2 ГДК  $Zn^{2+}$  спостерігалось інгібування цитохром-с-оксидази та активація лактатдегідрогенази печінки та зябер риб. За дії 0,5 та 2 граничнодопустимих концентрацій йонів кадмію відмічено зростання активності лактатдегідрогенази та інгібування цитохромоксидази досліджуваних тканин риб. Активність сукцинатдегідрогенази в тканинах риб зростала за дії допорогової концентрації  $Cd^{2+}$  та знижувалась за впливу 2 ГДК йонів кадмію.

*Ключові слова:* короп, щука, печінка, зябра, кадмій, цинк, сукцинатдегідрогеназа, цитохромоксидаза, лактатдегідрогеназа

Внаслідок нераціональної господарської діяльності людини, навколишнє водне середовище зазнає прогресуючого впливу дії токсикантів різного генезису, серед яких одне з провідних місць займають метали. Важливими для вивчення є метали, що знаходять широке застосування в різних сферах виробничої діяльності людини, такі, як кадмій, мідь, нікель, марганець, цинк тощо [3].

Підвищення рівнів концентрацій вищевказаних металів у водному середовищі вище допустимих призводить до надмірного акумулювання їх водними організмами, що обумовлює порушення нормального функціонування метаболічних систем у їх організмах. Ускладнюється оцінка стану забруднення водного середовища металами і тим, що їх токсичність зазнає модулюючого впливу температури, рН середовища, йонної сили розчину, вмісту кисню, присутності хелатуючих агентів, характеру живлення організму та ще цілого ряду зовнішніх та внутрішніх чинників [5].

На даний час багато досліджень присвячено вивченню закономірностей тканинного акумулювання металів у гідробіонтів, особливостей їх зв'язування та виведення з організму, транспорту йонів металів через мембрани тощо. Проте, особливості енергетичного забезпечення цих процесів є малодослідженими, тому метою роботи було визначення активності сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази та лактатдегідрогенази тканин риб за впливу підвищених концентрацій йонів цинку та кадмію.

### **Матеріал і методи досліджень**

Дослідження проведено на дворічках коропа (*Cyprinus caprio L.*) та щуки (*Esox lucius L.*) з середньою масою 300-350 г. Риб утримували в акваріумах об'ємом 200 л з відстояною водопровідною водою (вміст  $O_2$  складав  $7,5 \pm 0,5$  мг/дм<sup>3</sup>;  $CO_2$  –  $2,5 \pm 0,3$  мг/дм<sup>3</sup>; рН –  $7,8 \pm 0,1$ ).

Вивчали вплив йонів цинку та кадмію в концентраціях 0,05 і 0,2 мг/дм<sup>3</sup> та 0,5 мг/дм<sup>3</sup> і 2 мг/дм<sup>3</sup>, що відповідали 0,5 та 2,0 рибогосподарським ГДК для даних металів [1]. Необхідні концентрації йонів металів у воді створювали внесенням солей  $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$  та  $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$  кваліфікації “х.ч.”. Риб під час аклімації не годували. Період аклімації у риб становив 14 діб, що є достатнім для формування адаптивної відповіді на дію стрес-фактору [5].

Згідно поставлених завдань для дослідження відбирали тканини передньої долі гепатопанкреасу та зябрових дуг риб. Всі процедури відбору тканин виконували на холоді.

Досліджували наступні показники: активність цитохромоксидази і сукцинатдегідрогенази в мітохондріальних фракціях зябер і печінки та активність лактатдегідрогенази у цитоплазмі досліджуваних тканин.

Перед виділенням субклітинних фракцій тканини гомогенізували в охолоджену розчині такого складу: 0,22 М сахароза,  $10^{-4}$  М ЕДТА та 0,01 М тріс-НСІ (рН 7,2) у співвідношенні 1:5. Використовували “чда” глюкозу та ЕДТА, тріс - фірми “Мерк”, Німеччина. Ядра відокремлювали центрифугуванням при 2000-2500 об./хв 20 хв. Надосад зливали та центрифугували 30 хв. при 12000 об./хв. Надосад використовували як цитоплазматичну фракцію, а осад - як фракцію мітохондрій. Для визначення ферментативної активності виділені мітохондрії після промивання ресуспендували в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,8).

Активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) визначали ферриціанатним методом [4]. Визначення активності цитохромоксидази (ЦО) проводили за Штраусом [17]. Активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) визначали за швидкістю окиснення НАДН, яку реєстрували за зменшенням величини оптичної густини при 340 нм.

Вміст білка у мітохондріальній та цитоплазматичній фракціях визначали за методом Лоурі і співав.

Одержані дані були опрацьовані статистично з використанням пакету Excel.

### Результати досліджень та їх обговорення

**Активність сукцинатдегідрогенази.** СДГ каталізує окислення янтарної кислоти до фумарової і є одним з ключових регуляторних ферментів циклу трикарбонових кислот. Вона бере участь в здійсненні регуляції і взаємозв'язку окремих шляхів не тільки окислювального, але й пластичного обміну [2].

За дії йонів цинку встановлено дозозалежні та тканинспецифічні зміни активності сукцинатдегідрогенази у досліджуваних груп риб. Так, за дії допорогової кількості металу встановлено зростання активності ферменту у клітинах зябер і гепатопанкреасу коропа та шуки, відповідно, у 1,50 і 1,14 раза та у 1,24 і 1,31 раза ( $p < 0,05$ ). За дії 2 ГДК  $Zn^{2+}$  достовірні зміни активності ферменту відмічено лише у мітохондріях гепатоцитів риб, де його активність зросла у 1,73 раза в коропа та у 1,58 раза в шуки (рис. 1).

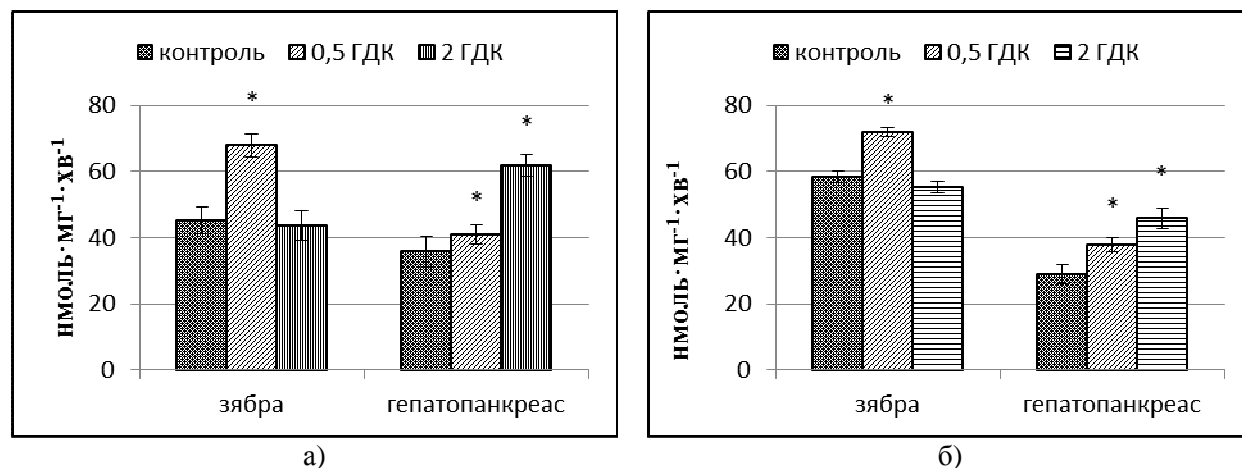


Рис. 1. Зміна активності сукцинатдегідрогенази в досліджуваних тканинах коропа (а) та шуки (б) за дії підвищених концентрацій йонів цинку ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Стимулювання циклу трикарбонових кислот може бути пов'язано як з безпосередньою активацією ферментів йонами цинку, так і зростанням енерговитрат на підтримання сталого рівня цинку [20]. В зябрах, на відміну від печінки, прослідковується концентраційна залежність дії цинку - стимулювання активності СДГ за дії 0,5 ГДК металу та відсутність змін за впливу 2 ГДК йонів металу.

За впливу кадмію, типового токсиканта, зміни в активності ферменту у досліджуваних тканинах риб відбуваються за такою схемою: дія допорогової концентрації йонів  $Cd^{2+}$  активує

сукцинатдегідрогеназу, тоді як за впливу сублетальної концентрації металу мало місце зниження її активності (рис. 2).

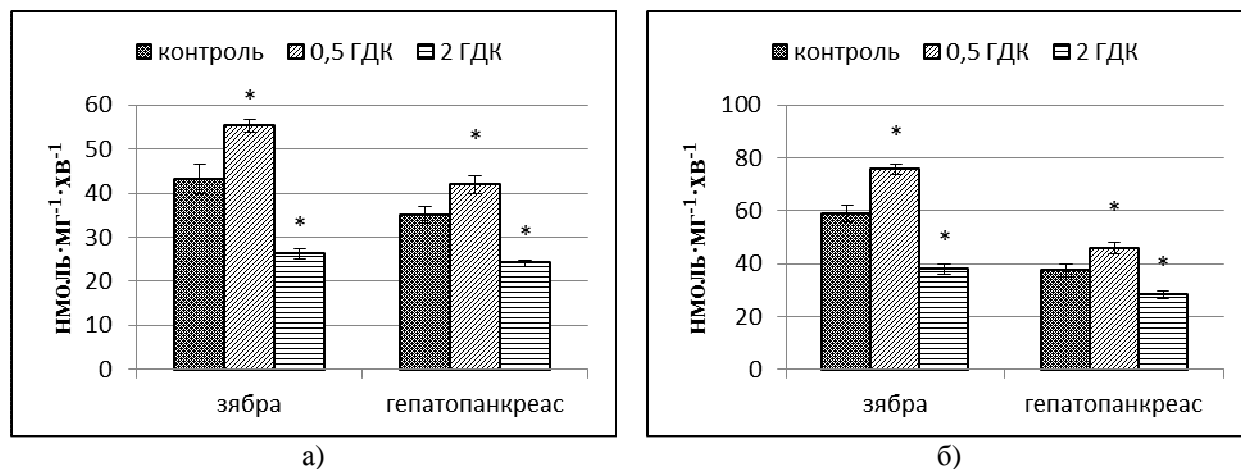


Рис. 2. Зміна активності сукцинатдегідрогенази в досліджуваних тканинах коропа (а) та щуки (б) за дії підвищених концентрацій йонів кадмію ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Аналіз результатів показав, що зміни активності сукцинатдегідрогенази більш виражені у клітинах зябер, порівняно з гепатоцитами риб, що, очевидно, обумовлено більшим кумулюванням йонів кадмію мітохондріями зябер [18].

Зростання активності ферменту за дії допорогової концентрації токсиканту, очевидно, є наслідком безпосередньої взаємодії йонів металу з регуляторним доменом ензиму [8]. Інгібування сукцинатдегідрогенази тканин коропа та щуки за дії 2 ГДК  $Cd^{2+}$ , очевидно, є наслідком комплексного впливу йонів кадмію на фермент, у результаті якого білковий ланцюг втрачає свою нативну структуру [8, 15].

**Активність цитохромоксидази.** Цитохромоксидаза векторний фермент внутрішньої мембрани мітохондрій, що відіграє ключову роль в регуляції швидкості окисного фосфорилування [9] та є надзвичайно чутливим до лігандів різної природи. Така надрегульованість пов'язана з тим, що векторні ферменти виконують важливі функції і мають великий запас адаптивних можливостей [10].

За впливу допорогової концентрації  $Zn^{2+}$  встановлено достовірне зростання активності ЦО, відповідно, у 1,62 і 1,49 раза в коропа та у 1,38 і 1,25 раза в щуки (рис. 3).

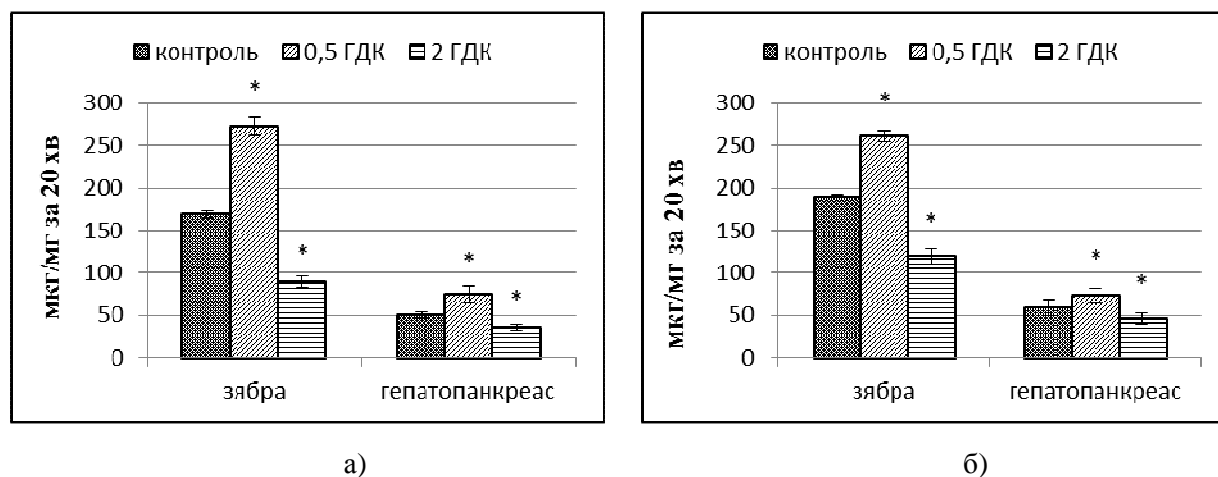


Рис. 3. Зміна активності цитохромоксидази в досліджуваних тканинах коропа (а) та щуки (б) за дії підвищених концентрацій йонів цинку ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Відомо, що до складу цитохромоксидази входять шість атомів металу – 2 атоми заліза, 2 - міді, 1 - цинку та 1 атом магнію [16]. Це обумовлює високу чутливість цитохром-с-оксидази до

екзогенного впливу йонів металів. Вплив сублетальної концентрації металу індукує зниження каталітичної активності ферменту у 1,89 і 1,39 раза, відповідно, в зябрах та гепатопанкреасі коропа та у 1,58 і 1,27 раза – в щуки ( $p < 0,05$ ). Токсичний ефект йонів цинку на енергетичне забезпечення клітини пов'язують із порушеннями транспорту протонів у мітохондріях [6, 19] та зміною конформаційної структури ферменту навколо білка  $\alpha_3$  [7].

За впливу 0,5 ГДК кадмію в печінці щуки активність цитохромоксидази достовірно зросла у 1,17 раза. Натомість за дії допорогової та сублетальної кількості йонів кадмію в зябрах та гепатопанкреасі коропа та щуки встановлена загальна тенденція до зниження функціональної активності ферменту (рис. 4).

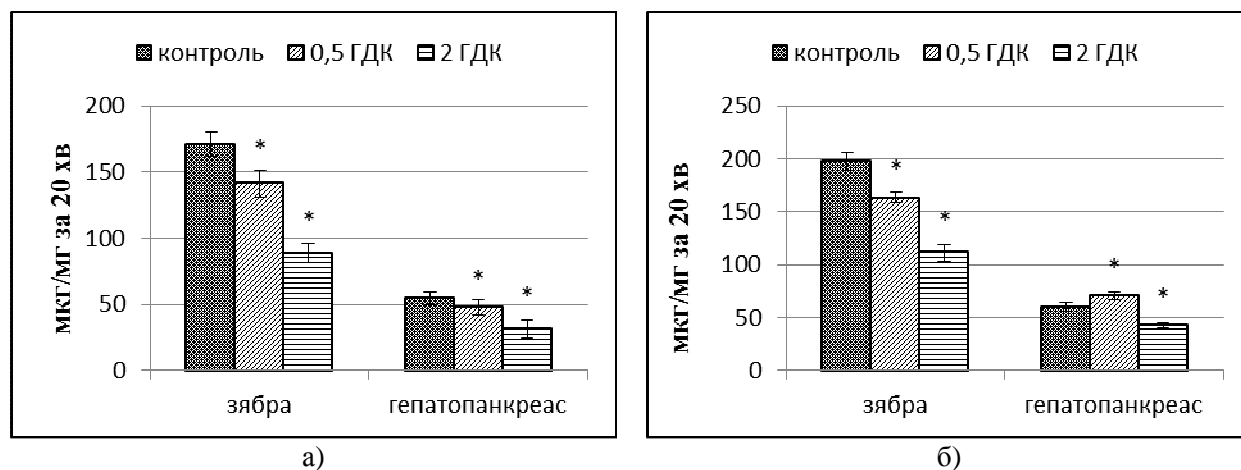


Рис. 4. Зміна активності цитохромоксидази в досліджуваних тканинах коропа (а) та щуки (б) за дії підвищених концентрацій йонів кадмію ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Відомо, що за хронічної інтоксикації йонами кадмію, на початкових етапах спостерігається посилення інтенсивності тканинного дихання, котре в подальшому поступається місцем зворотному процесу [11]. У дослідженнях [13, 14] показано, що йони  $Cd^{2+}$  можуть інгібувати ряд АТФ-аз, локалізованих в мітохондріальній мембрані. Можна припустити, що це здійснює опосередкований вплив і на функціонування цитохром-с-оксидази.

**Активність лактатдегідрогенази.** За дії підвищених концентрацій йонів цинку спостерігається дозозалежний характер змін активності ЛДГ у досліджуваних тканинах коропа та щуки (рис. 5).

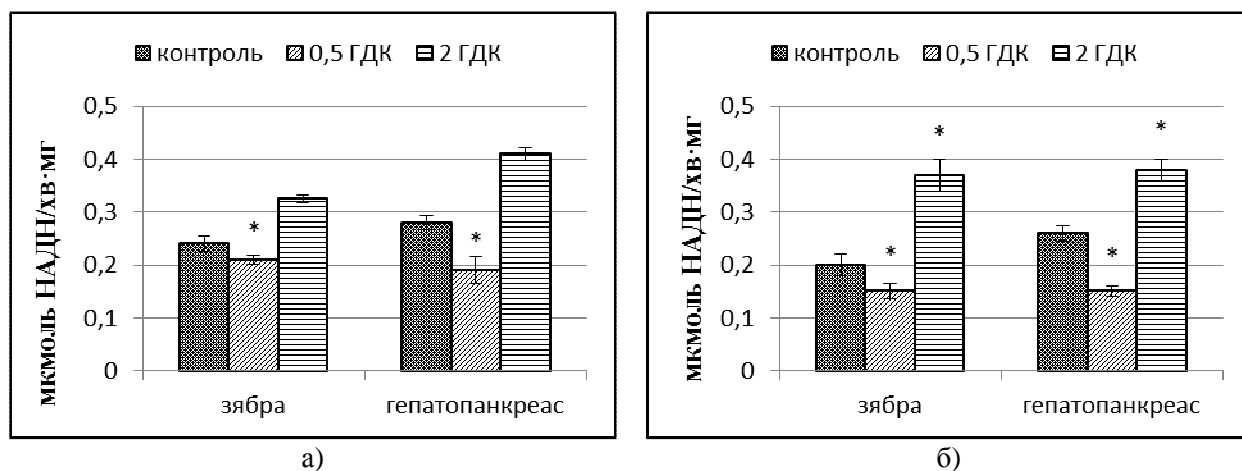


Рис. 5. Активність лактатдегідрогенази в тканинах коропа (а) та щуки (б) за дії підвищених концентрацій цинку ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Так, за дії допорогової концентрації  $Zn^{2+}$  встановлено зниження активності ферменту у зябрах і гепатопанкреасі риб, відповідно, у 1,14 і 1,47 раза та у 1,33 і 1,73 раза ( $p < 0,05$ ), що,

очевидно, може бути пов'язано з активацією аеробного шляху енергозабезпечення. У той же час за впливу сублетальної концентрації йонів металу спостерігається активація ЛДГ у всіх досліджуваних тканинах риб. Такі зміни можна розглядати як компенсаторну реакцію клітини на роз'єднання йонами  $Zn^{2+}$  окисного фосфорилування та тканинного дихання на рівні цитохромоксидази.

За дії допорогової кількості йонів  $Cd^{2+}$  відзначається достовірне зниження активності лактатдегідрогенази у 1,23 раза в клітинах гепатопанкреасу щуки, що, очевидно, пов'язано з активацією аеробного шляху метаболізму в цій тканині (рис. 6).

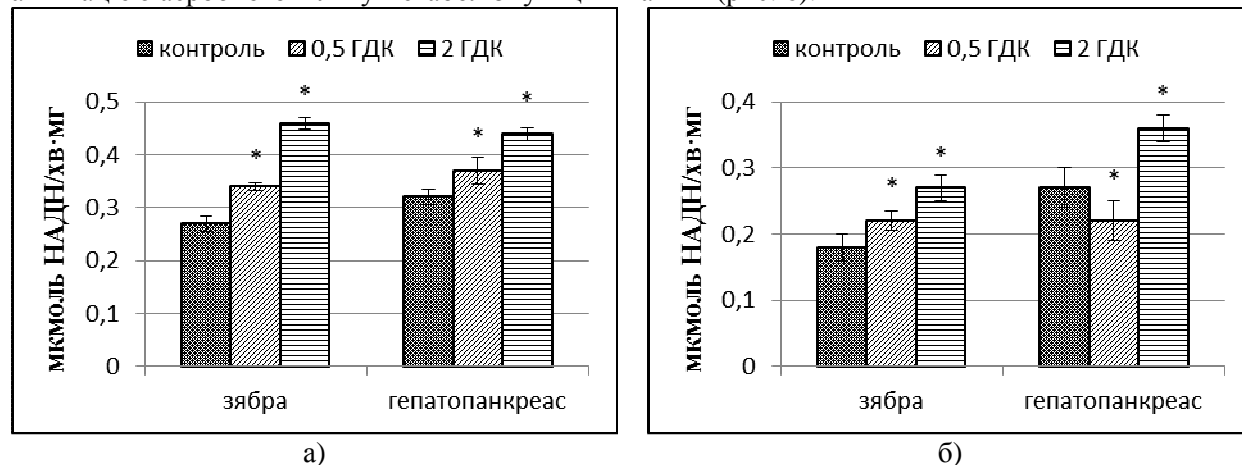


Рис. 6. Активність лактатдегідрогенази в тканинах коропа (а) та щуки (б) за дії підвищених концентрацій кадмію ( $M \pm m$ ;  $n=5$ )

Разом з тим інгібування фермента може бути обумовлено порушенням конформаційної структури білкової молекули [12].

За впливу 2 ГДК йонів  $Cd^{2+}$  спостерігається загальна тенденція до зростання активності ЛДГ у досліджуваних тканинах коропа та щуки, що можна розглядати як компенсаторну реакцію на роз'єднання йонами  $Cd^{2+}$  окисного фосфорилування та тканинного дихання на рівні цитохромоксидази шляхом активації анаеробної гілки енергозабезпечення.

### Висновки

1. Інтенсивність змін енергетичного обміну в організмі риб за дії йонів металів залежить від концентрації металу у середовищі та його фізико-хімічних властивостей.
2. Дія допорогової концентрацій йонів цинку призводила до активації СДГ і ЦО та інгібування ЛДГ тканин коропа і щуки. За впливу 2 ГДК  $Zn^{2+}$  спостерігалось інгібування цитохром-с-оксидази та активація ЛДГ печінки та зябер риб.
3. За дії 0,5 та 2 ГДК йонів кадмію відмічено зростання активності ЛДГ та інгібування цитохромоксидази досліджуваних тканин риб. Активність сукцинатдегідрогенази в тканинах риб зростала за дії допорогової концентрації  $Cd^{2+}$  та знижувалась за впливу 2 ГДК йонів кадмію.
4. Зростання концентрації йонів цинку та кадмію у воді активує анаеробну гілку енергозабезпечення у гідробіонтів та пригнічує аеробну.

1. *Беспмятнов Г.П.* Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. Справочник. /Г.П. Беспмятнов, Ю.А. Кротов. – Л.: Химия, 1985. – 304 с.
2. *Вольский Г.Г.* О характере и особенностях регуляции сукцинатдегидрогеназы глюкокортикоидами / Г.Г. Вольский, Л.М. Осадчая // Митохондрии. Транспорт электронов и преобразование энергии. – М.: Наука, 1976. – С. 164–168.
3. *Евтушенко Н.Ю.* Особенности накопления тяжелых металлов в тканях рыб Кременчугского водохранилища /Н.Ю. Евтушенко, О.В. Данилко// Гидробиол. журн., 1996. – Т. 32, №4. – С. 58–66.
4. *Определение активности сукцинатдегидрогеназы // Современные методы в биохимии* [под ред. В.Н. Ореховича.] – М.: Медицина, 1977. – С. 44.
5. *Хочачка П.* Биохимическая адаптация / П. Хочачка, Дж. Сомеро – М.: Мир, 1988. – 568 с.

6. *A role for subunit III in proton uptake into the D pathway and a possible proton exit pathway in Rhodobacter sphaeroides cytochrome c oxidase.* /[D.A. Mills, Z. Tan, S. Ferguson-Miller, J. Hosler]// *Biochemistry.*, 2003. – Vol. 42 – P. 7410–7417.
7. *Aagaard A. Zinc ions inhibit oxidation of cytochrome c oxidase by oxygen.* /A. Aagaard, P. Brzezinski// *FEBS Lett.*, 2001. – Vol. 494 – P. 157–160.
8. *Cadmium-dependent enzyme activity alteration is not imputable to lipid peroxidation.* /[E. Casalino, G. Calzaretto, C. Sblano, C. Landriscina]// *Archives of Biochemistry and Biophysics.* – 2000. – Vol. 383, № 2 – P. 288–295
9. *Kadenbach B. Regulation of respiration and ATP synthesis in higher organisms: hypothesis* /B. Kadenbach// *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1986. – Vol. 18. – P. 39–54
10. *Karin N.I. Regulation of Na, K- ATPase by its biosynthesis and turnover* /Karin N.I., Cook I.S.// *Curr. Top. in Membr. And Transp.*, 1983. – Vol. 19. – P. 713–751.
11. *Müller L. Cadmium-induced alteration of the energy level in isolated hepatocytes.* /L. Müller and F.K. Ohnesorge// *Toxicology.*, 1984. – Vol. 31 – P. 297–306.
12. *Ochiai E.I. Toxicity of heavy metals and biological defense: principes and application in bioinorganic chemistry* /E.I. Ochiai// *J. Chem. Educ.*, 1995. – Vol. 72, № 6. – P. 479–484.
13. *Pedrenho A.R. Inhibitory effects of cadmium and lead on (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)ATPase of *Electrophorus electricus* (L.) electrocyte* / A.R. Pedrenho, G.M. Meilhac, A. Hassón-Voloch // *Toxic Subs. Mechan.*, 1996. – Vol. 15. – P. 231–247.
14. *Pivovarova N. Effect of cadmium on the ATPase activity in gills of *Anodonta cygnea* at different assay temperatures.* /N Pivovarova, K. Lagerspetz// *J. Therm. Biol.*, 1996. – Vol. 21. – P. 77–84.
15. *Possible involvement of adenine nucleotide translocase in the activation of the permeability transition pore induced by cadmium.*/[C. Zazueta, C. Sanchez, N. Gargia, F. Correa]// *Intl. J. Biochem. Cell Biol.*, 2000. – Vol. 32 – P. 1093–1101.
16. *Poyton R. O. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes* /R. O. Poyton, J.E. Mcewen// *Ann. Rev. Biochem.*, 1996. – Vol. 65. - P. 563–607.
17. *Straus W. Colorimetric microdetermination of cytochrome c oxidase* /W. Straus// *J. Biol. Chem.*, 1954. – Vol. 207, №2. – P. 733.
18. *The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*.* /[Eds. V.S. Kennedy, R.I.E. Newell, A.F. Eble]// *A Maryland Sea Grant Book, College Park, Maryland*, 1996. – P. 234–246.
19. *The inhibitory binding site(s) of Zn<sup>2+</sup> in cytochrome c oxidase.* /[F. Francia, L. Giachini, F. Boscherini et al.]// *FEBS Lett.*, 2007. – Vol. 581 – P. 611–616.
20. *Yamaguchi M. Role of zinc as an activator of mitochondrial function in rat liver* /M. Yamaguchi, M. Kura, S. Okada// *Biochemical Pharmacology* - 1982. - Vol. 31, №. 7 - P. 1289–1293.

Ю.И. Сенік, І.Ю. Найко, Т.В. Маркова, О.А. Луцив, В.Я. Бияк, В.З. Курант  
 Тернопільський національний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка  
 ЧВУЗ "Буковинський університет"

#### ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЕ ТКАНЕЙ ЖАБР И ПЕЧЕНИ РЫБ ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ ЦИНКА И КАДМИЯ

Исследовано активність сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази і лактатдегідрогенази жабр і печені карпа і щуки при діянні 0,5 і 2 рыбохозяйственных предельно допустимых концентраций ионов цинка и кадмия. Действие допороговой концентрации ионов цинка приводило к увеличению активности сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази і снижению активности лактатдегідрогенази тканей карпа і щуки. При влиянии 2 ПДК Zn<sup>2+</sup> наблюдалось снижение активности цитохром-с-оксидази і активация лактатдегідрогенази печені і жабр рыб. За діяння 0,5 і 2 предельно допустимых концентраций ионов кадмия отмечен рост активности лактатдегідрогенази і ингибирование цитохромоксидази исследуемых тканей рыб. Активність сукцинатдегідрогенази в тканях рыб увеличивалась при діянні допороговой концентрации Cd<sup>2+</sup> і снижалась при воздействии 2 ПДК ионов кадмия.

*Ключевые слова:* карп, щука, печень, жабры, кадмий, цинк, сукцинатдегідрогеназа, цитохромоксидаза, лактатдегідрогеназа

*Yu.I. Senyk, I.Yu. Nayko, T.V. Markova, O.A. Lutsiv, V.Ya Byyak, V.Z. Kurant*  
 Ternopil V. Hnatiuk National Pedagogical University, Ukraine  
 PVNZ "Bukovina University"

ENERGY-SUPPLY OF GILLS AND LIVER TISSUES OF FISH UNDER THE INFLUENCE OF ZINC AND CADMIUM IONS

The activity of succinate dehydrogenase, cytochrome oxidase and lactate dehydrogenase in gills and liver tissues of carp and pike exposed to 0,5 and 2 of fisheries maximum permissible concentration (MPC) of zinc and cadmium ions were investigated. The effect of subthreshold concentrations of zinc ions leads to the activation of succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase and inhibition the lactate dehydrogenase activities of carp and pike tissues. Under the effect of 2 MPC of zinc ions the inhibition the activities of cytochrome c oxidase and lactate dehydrogenase in liver and gills tissues of fish was observed. Under the influence of 0,5 and 2 MPC of cadmium ions the increase of lactate dehydrogenase activity and cytochrome oxidase inhibition of investigated tissues of fish were observed. The succinate dehydrogenase activity in fish tissues increased by subthreshold concentrations of cadmium ions and decreased by exposure to 2 MPC of cadmium ions.

*Keywords: carp, pike, liver, gills, cadmium, zinc, succinate dehydrogenase, cytochrome oxidase, lactate dehydrogenase*

Рекомендує до друку  
 В.В. Грубінко

Надійшла 7.08.2012

УДК 571.1

В. В. ЩЕРБИК, Л. П. БУЧАЦЬКИЙ

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка  
 вул. Володимирська, 64, Київ, 01601

**СТАЛА ТОНКОЇ СТРУКТУРИ І БУДОВА БІЛКА**

Показано, що стала тонкої структури може бути представлена амінокислотами генетичного коду та їх поліпептидним ланцюгом. Числове значення зворотної величини сталої тонкої структури можна виразити через величини протонних зарядів амінокислотних залишків і зворотну величину деякого протонного заряду в різних періодичних базисах остова білка.

*Ключові слова: стала тонкої структури, поліпептидний ланцюг, протонний заряд амінокислотного залишку, базис остова білка.*

Стала тонкої структури  $\alpha = e^2 / \hbar c \approx 1 / 137$  ( $e$  – заряд електрона,  $\hbar$  – стала Планка,  $c$  – швидкість світла) характеризує інтенсивність електромагнітної взаємодії елементарних частинок. У квантовій електродинаміці заряджені частинки взаємодіють завдяки обміну віртуальними фотонами. Стала тонкої структури виникає як безрозмірний параметр, що характеризує інтенсивність цієї взаємодії. Стала тонкої структури – це одна з величин, яку фізики вимірюють з усе зростаючою точністю вже багато десятиліть. Саме вона визначає енергетичні рівні електронів в атомах. Тонка структура цих рівнів з'являється за рахунок електричного тяжіння електронів до ядра і електромагнітної взаємодії між електронами. Найбільш точне значення сталої тонкої структури було отримано в недавніх експериментах по вимірюванню магнітного моменту електрона, проведених групою під керівництвом Джеральда Габріельса [1] з Гарвардського університету. Виміряне ними значення зворотної сталої тонкої структури складає:  $1/\alpha = 137,035999084 \pm 0,000000051$ .

Константа  $\alpha$  була введена в фізику Зоммерфельдом [2] у 1916 році при створенні теорії тонкої структури рівнів енергії атома водню. Спочатку стала тонкої структури була визначена як відношення швидкості електрона на нижчій борівській орбіті до швидкості світла.