

БІОХІМІЯ

УДК 636.2:599.323.41:576.344

В.З. КУРАНТ

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

МЕТАБОЛІЗМ РАДІОАКТИВНО МІЧЕНИХ АМІНОКИСЛОТ В ОРГАНІЗМІ КОРОПА ЗА ДІЇ ЙОНІВ МЕТАЛІВ

Наведені дані про вплив йонів марганцю, цинку, міді та свинцю на метаболізм [$U^{14}C$]-амінокислот в печінці та скелетних м'язах коропа в умовах *in vitro*. Встановлено, що за дії йонів зазначених металів відбувається перерозподіл вільних амінокислот в органах і тканинах риб шляхом активації протеолітичних процесів, в основному, в скелетних м'язах, що призводить до підвищення їх концентрації у печінці. Показано, що радіоактивність гомогенатів як печінки, так і м'язів знижується відносно контрольних величин за інтоксикації йонами досліджуваних металів в ряді: $Mn > Zn > Cu > Pb$.

Ключові слова: прісноводні риби, йони металів, метаболізм, амінокислоти

В дослідженнях, проведених з радіоактивно міченими амінокислотами, встановлено, що у ссавців амінокислоти поряд з використанням в синтезі тканинних білків є джерелом для утворення субстратів циклу трикарбонових кислот, глюконеогенезу, ліпогенезу, синтезу нуклеїнових кислот. В середньому за фізіологічних умов до 25 % амінокислот в тканинах ссавців використовуються у субстратному забезпеченні цих процесів [2, 14, 16, 17].

На відміну від ссавців, у риб частка амінокислот лише в субстратному забезпеченні енергетичного обміну може складати 50-90%. Це пояснюється дією багатьох екстремальних факторів навколишнього середовища, зокрема харчових, температурних, міграційних, і потребує швидкого вилучення метаболічної енергії з легкодоступних субстратів для забезпечення нормального функціонування їх організму [10, 12].

Враховуючи те, що для гідробіонтів характерний високий внутрішньоклітинний пул амінокислот, а амінокислотному обміну належить важлива функція в підтриманні життєво важливих процесів в організмі риб (генерації енергії, регуляції осмотичного тиску, знешкодження аміаку, токсикантів і т.п.) [4, 6, 9], метою цієї роботи було дослідження особливостей метаболізму суміші двадцяти радіоактивно мічених амінокислот у печінці та скелетних м'язах коропа при інтоксикації його організму йонами металів, а саме ступеня їх використання в синтезі білків, ліпідів і вуглеводів, а також в субстратному забезпеченні циклу трикарбонових кислот.

Матеріал і методи досліджень

Вивчався вплив йонів марганцю, цинку, міді та свинцю в організмі коропа (*Cyprinus carpio* L.) дворічного віку в кількостях, що відповідали 2-ом рибогосподарським гранично допустимим концентраціям (ГДК) [1]. При цьому концентрації досліджуваних металів в перерахунку на йони були такі: марганцю – 2,4 мг/дм³; цинку – 2,0 мг/дм³; міді – 0,2 мг/дм³ та свинцю – 0,2 мг/дм³. Ці концентрації є такими, що в переважній більшості випадків використовуються в

дослідженнях при вивченні інтоксикацій і викликають формування в організмі риб адаптивної реакції на стрес-фактор [4, 11, 15].

Інтоксикацію моделювали внесенням у воду акваріумів, де знаходилися дослідні групи риб, солей $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ та $Pb(NO_3)_2$ до досягнення вказаних концентрацій йонів металів. З метою зниження впливу на риб їх власних екзотметаболітів воду в акваріумах змінювали щодоводово, аклімацію риб здійснювали протягом 14 діб.

Для дослідження брали тканини печінки та скелетних м'язів спини, їх гомогенізували в розчині Рінгера для холоднокровних (рН=7,2) у скляному гомогенізаторі на холоді. Бюкси, які містили гомогенати 100 мг скелетних м'язів чи печінки, 2 мл розчину Рінгера і 20 кБк суміші $[U^{14}C]$ -амінокислот, інкубували в термостаті при 25°C протягом 60 хв. Утворений в процесі інкубації CO_2 вловлювали 20 % водним розчином $NaOH$ і визначали його радіоактивність на сцинтиляційному лічильнику ЛКВ (Швеція). Ферментативні процеси в інкубаційному середовищі припиняли додаванням до гомогенатів 2 мл 10 % розчину трихлороцетової кислоти [3]. Ліпіди з гомогенатів тканин екстрагували сумішшю хлороформ-метанол 2:1 за методом Фолча [5] і визначали радіоактивність на вказаному лічильнику у толуоловому сцинтиляторі. Радіоактивність білків у гомогенаті визначали після видалення ліпідів, глікогену, глюкози та інших водорозчинних речовин. Радіоактивність глікогену і глюкози визначали за методом М. І. Прохорової [8]. Одержані дані опрацьовували статистично [7].

Результати досліджень та їх обговорення

Дані, наведені в табл. 1., свідчать про те, що за фізіологічних умов як у печінці, так і в скелетних м'язах, ступінь використання радіоактивної мітки суміші $[U^{14}C]$ амінокислот в синтезі тканинних білків складає відповідно – 62,3% і 65,3%, ліпідів – 16,8% і 16,1%, вуглеводів – 10,8% і 9,6%, диоксиду карбону – 10,0 % і 8,8%. При цьому, використання $[U^{14}C]$ амінокислот в синтезі тканинних білків і продукції CO_2 у м'язах відповідно в 1,6 та 2,0 раза менше, ніж у печінці. Ці дані вказують на те, що печінці в організмі риб належить головна роль у формуванні та перерозподілі міжорганного фонду амінокислот [13].

Таблиця 1

Радіоактивність білків, які утворились після інкубації гомогенатів печінки та м'язів з $[U^{14}C]$ сумішшю амінокислот (тис.імп./хв на 100 мг вології тканини, $M \pm n$, $n=5$)

Метали	Печінка	М'язи
Контроль	5,13±0,04	3,08±0,05
Марганець	4,23±0,08*	2,17±0,05*
Цинк	3,81±0,01*	2,05±0,03*
Мідь	3,56±0,02*	1,84±0,01*
Свинець	3,25±0,05*	1,83±0,02*

Під дією йонів металів, концентрація яких була рівна 2 ГДК, змінюється загальна радіоактивність білків, ліпідів, вуглеводів та вуглекислого газу в тканинах риб дослідних груп. Зокрема, в печінці йони всіх досліджуваних металів знижують активність включення суміші амінокислот в білки. Так, марганець знижує активність цього процесу на 17,5%, цинк на 25,7%, мідь на 31,0% і свинець на 36,6%. Аналогічні зміни активності синтезу білків під впливом йонів металів спостерігали і в м'язах риб. При цьому марганець зменшував цей показник на 29,5%, цинк на 33,4%, мідь на 40,2% та свинець на 40,6%. Як в печінці, так і в м'язовій тканині коропа найбільшою мірою інгібував процес включення амінокислот в білки свинець, а найменше впливав на нього марганець.

Крім участі в синтезі білків, мічені амінокислоти активно включаються в ліпіди, особливо в печінці риб. При цьому активність процесу також змінювалась під впливом досліджуваних металів (табл. 2.).

Таблиця 2

Радіоактивність ліпідів, які утворились після інкубації гомогенатів печінки та м'язів з $[U^{14}-C]$ сумішшю амінокислот (тис.імп./хв на 100 мг вологої тканини, $M \pm n$, $n=5$)

Метали	Печінка	М'язи
Контроль	1,39±0,03	0,76±0,04
Марганець	1,60±0,01*	0,94±0,01*
Цинк	1,53±0,02*	0,74±0,01
Мідь	1,27±0,05	0,62±0,01*
Свинець	2,04±0,03*	0,87±0,05

Так, в печінці дослідних риб марганець, цинк та свинець підвищували включення амінокислот в ліпіди на 15,1, 10,1 і 46,7% відповідно, і лише мідь знижує активність цього процесу на 8,6%. В м'язовій тканині марганець та свинець викликали зростання субстратного забезпечення амінокислот у синтезі ліпідів на 23,7 та 14,5% відповідно, мідь вела до зниження його на 18,4%, а цинк практично не впливав на цей показник.

Одержані дані не можна пояснити однозначно, оскільки в літературі не описані ферментні системи, в яких свинець виступав би активатором ферментів ліпогенезу. Можливо, що йони свинцю в токсичних концентраціях інактивують гліколітичні ферменти, зміщуючи метаболічну рівновагу перетворення субстратів в бік ліпогенезу.

Вклад амінокислот у субстратне забезпечення синтезу вуглеводів значно менший, ніж у синтез білків чи ліпідів (табл. 3.). Підвищення концентрації всіх досліджуваних металів у воді веде до зниження активності цього процесу як в печінці, так і в м'язах коропа.

Таблиця 3

Радіоактивність вуглеводів, які утворились після інкубації гомогенатів печінки та м'язів з $[U^{14}-C]$ сумішшю амінокислот (тис.імп./хв на 100 мг вологої тканини, $M \pm n$, $n=5$)

Метали	Печінка	М'язи
Контроль	0,88±0,01	0,45±0,01
Марганець	0,72±0,01*	0,35±0,01*
Цинк	0,65±0,02*	0,22±0,01*
Мідь	0,55±0,01*	0,18±0,01*
Свинець	0,25±0,01*	0,12±0,01*

Більшою мірою зниження включення амінокислот до складу вуглеводів відбувається під впливом йонів міді та свинцю (відповідно на 37,5 і 71,6% в печінці та на 60,0 і 73,3% в м'язах). Йони марганцю та цинку знижують цей показник на 18,2 і 26,1% в печінці та на 22,2 і 51,1% в м'язах.

Заслугове на увагу вивчення вкладу амінокислот у субстратне забезпечення енергетичних процесів в тканинах коропа при дії на його організм йонів металів. Як в печінці, так і в м'язах, в результаті дії всіх досліджуваних металів зростає кількість виділеного CO_2 , що може свідчити про активацію циклу трикарбонових кислот (табл. 4.). В печінці марганець підвищував активність цього процесу на 30,5%, цинк на 15,8%, мідь на 78,0% і свинець на 87,8%. В м'язах виділення вуглекислого газу зростало під дією марганцю на 31,7%, цинку на 65,8%, міді на 75,6% та свинцю на 63,4%.

Якщо умовно прийняти ступінь використання суміші $[U^{14}-C]$ амінокислот в синтезі кожних із досліджуваних сполук у контрольній групі риб за 100%, то можна виявити чіткі закономірності впливу на перерозподіл амінокислот між анаболічними та катаболічними фондами тканин таких пар йонів як марганець і цинк та мідь і свинець. Нами виявлено, що якщо за дії йонів міді та свинцю в печінці риб зменшується використання $[U^{14}C]$ амінокислот в синтезі тканинних білків, то їх участь у субстратному забезпеченні енергетичних процесів значно зростає. Зменшення різниці радіоактивності білків та вуглекислого газу для йонів марганцю та цинку значно нижча, ніж для йонів міді та свинцю.

Радіоактивність CO₂, що утворився після інкубації гомогенатів печінки та м'язів з [U-¹⁴C] - амінокислотами (тис.імп./хв на 100 мг вологої тканини, M±n, n=5)

Метали	Печінка	М'язи
Контроль	0,82±0,02	0,41±0,04
Марганець	1,07±0,01*	0,54±0,01*
Цинк	0,95±0,04*	0,68±0,02*
Мідь	1,46±0,05*	0,72±0,01*
Свинець	1,54±0,03*	0,67±0,02*

При порівнянні використання [U-¹⁴C] амінокислот у субстратному забезпеченні анаболічних та катаболічних процесів в печінці та м'язах риб також можна простежити певні закономірності, хоча відмічені і деякі тканинні особливості згаданих перетворень. Враховуючи те, що в наших дослідженнях використовували "маркерні" концентрації субстрату [U-¹⁴C] амінокислот, які не здатні істотно змінити внутрішньоклітинний амінокислотний пул і активувати аміноацил-тРНК-синтетази, слід констатувати, що за дії металів *in vivo* відбувається посилення протеолізу білків як у м'язах, так і в печінці риб, що приводить до зростання концентрації амінокислот до рівня активації їх трансаміназ, оскільки константи Міхаеліса-Ментен значно нижчі для аміноацил-тРНК-синтетаз, ніж для трансаміназ та декарбоксілаз амінокислот. Отже, за дії йонів металів *in vivo* в досліджуваних тканинах формується фонд вільних амінокислот, який у печінці складається з потоку амінокислот, вилучених в результаті протеолізу м'язових білків, протеолізу власних білків, фонду власних амінокислот та тих амінокислот, які утворюються в результаті протеолізу білків крові. В м'язовій тканині виявлений нижчий рівень окиснення амінокислот, порівняно з печінкою (за винятком розгалужених) [16], про що свідчить висока радіоактивність інкубаційного середовища після припинення ферментативних процесів у гомогенатах та їх центрифугування. Очевидно, що певна кількість амінокислот в умовах *in vitro* на фоні зниження синтезу тканинних білків, не зважаючи на посилення протеолізу білків, не використовується і знаходиться в метаболічно незадіяному стані.

Висновки

Виявлено суттєвий вклад досліджених амінокислот у субстратне забезпечення синтезу білків, ліпідів та вуглеводів, а також в генерування енергії в печінці та м'язовій тканині коропа як за фізіологічних умов існування риб, так і при дії на їх організм підвищених концентрацій йонів марганцю, цинку, міді та свинцю.

Катаболічний фонд вільних амінокислот у риб за дії йонів металів формується, в основному, за рахунок білків м'язів, які є основним джерелом їх надходження в печінку для підтримання її енергетичного гомеостазу і синтезу специфічних ферментних систем, білків, необхідних для зв'язування, транспорту та вилучення з організму риб досліджуваних стрес-факторів.

1. *Беспамятнов Г. П.* Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде / Г. П. Беспамятнов, Ю. А. Кротов. – Л. : Химия, 1985. – 240 с.
2. *Бродин С. В.* Метаболизм лейцина, триптофана и аланина в тканях крупного рогатого скота : автореф. дис. на соискание науч. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.04 "Биохимия" / С. В. Бродин. – Львов, 1990. – 23 с.
3. *Виноградова Р.П.* Біологічна хімія [Практикум] / Р. П. Виноградова, М. Є. Кучеренко, А. Р. Литвиненко. – К. : Вища школа, 1977. – 384 с.
4. *Грубінко В. В.* Адаптивні реакції риб до дії аміаку водного середовища: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. біол. наук : спец. 03.00.17 "Гідробіологія", 03.00.04 "Біохімія" / В. В. Грубінко. – Київ, 1995. – 44 с.
5. *Кейтс М.* Техника липидологии / М. Кейтс. – М. : Мир, 1975. – 324 с.
6. *Лав Р. М.* Химическая биология рыб / М. Р. Лав. – М. : Пищ. пром-сть, 1976. – 349 с.
7. *Лакин Г. Ф.* Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М. : Высшая школа, 1990. – 351 с.

8. Прохорова М. И. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / М. И. Прохорова. – Л. : Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.
9. Сидоров В.С. Аминокислоты рыб / В. С. Сидоров // Биохимия молоди пресноводных рыб. – Петрозаводск, 1985. – С. 103–137.
10. Сорвачёв К. Ф. Основы биохимии питания рыб / К. Ф. Сорвачёв. – М. : Лёгкая и пищевая пром-сть, 1982. – 247 с.
11. Филенко О. Ф. Некоторые универсальные закономерности действия химических агентов на водные организмы : автореф. дис. на соискание учен. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.18 “Гидробиология” / О. Ф. Филенко. – М., 1990. – 36 с.
12. Яковенко Б. В. Особливості метаболізму гліцину в організмі коропа лускатого : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. біол. наук : спец. 03.00.04 “Біохімія” / Б.В. Яковенко. – Львів, 1993. – 38 с.
13. Cowey C. B. The nutrition of fish: The developing scene / C. B. Cowey // Nutrition Research Reviews. – 1988. – Vol. 1. – P.255–280.
14. Friedman M. Absorption of amino acids / M. Friedman. – Berlin, 1989. – 223 p.
15. Metal accumulation and metallothionein in two populations of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments during a run-off episode / Olsvik P. A., Gundersen P., Andersen R. A. [et al.] // Aquat. Toxicol. – 2000. – Vol. 50, № 4. – P. 301–316.
16. Palmer T. N. Alanin and inter-organ relationships in branched-chain amino and 2-oxo acid metabolism / T. N. Palmer // Bioscience Reports. – 1985. – P. 1015–1033.
17. Simon O. Metabolism of proteins and amino acids. Protein metabolism in farm animals / O. Simon. – Oxford : Univ. Press, 1989. – P. 274–366.

V.Z. Kurant

Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка, Украина

МЕТАБОЛИЗМ РАДИОАКТИВНО МЕЧЕНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ОРГАНИЗМЕ КАРПА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ

В организме рыб под действием ионов металлов происходит перераспределение свободных аминокислот путем активации протеолитических процессов, в основном, в скелетных мышцах, что вызывает возрастание их концентрации в печени. Изменения в субстратном обеспечении анаболических и катаболических процессов в тканях рыб в большей степени выражены при воздействии ионов Cu^{2+} и Pb^{2+} , чем при действии ионов Zn^{2+} и Mn^{2+} .

Ключевые слова: пресноводные рыбы, ионы металлов, метаболизм, аминокислоты

V.Z. Kurant

Ternopil Volodymyr Hnatyuk National Pedagogical University, Ukraine

METABOLISM OF RADIOLABELED AMINOACIDS IN ORGANISM OF CARP UNDER THE INFLUENCE OF IONS OF METALS

It has been noticed that under the influence of metal ions in a fish organism there takes place redistribution of free amino acids (in skeletal muscles mainly) by means of proteolytic processes activation, which leads to an increase of their concentration in liver. The changes in the substrate supply of anabolic and catabolic processes in fish tissues manifest themselves to a greater extent under the influence of Cu^{2+} and Pb^{2+} ions than under Zn^{2+} and Mn^{2+} ions.

Key words: freshwater fish, metal ions, metabolism, amino acids

Рекомендує до друку

Надійшла 15.02.2013

В.В. Грубінко