

Г. Є. Киричук

Вміст білків у тканинах витушки пурпурної (*Mollusca : Gastropoda : Pulmonata : Bulinidae*) при дії іонів металів

(Представлено академіком НАН України В. Д. Романенком)

Досліджено вплив низьких концентрацій (ЛК₂₅⁴⁸) іонів важких металів (Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+}) на вміст деяких метаболітів білкового обміну (альбумінів, глобулінів та показника білкового індексу) в гемолімфі, гепатопанкреасі та мантиї неінвазованих *Planorbarius purpura*. Встановлено, що вплив таких іонів на білки у кожній з досліджених тканин є багатовекторним і має загальний регуляторно-токсичний принцип дії. Він відзначається зростанням вмісту альбумінів та зменшенням кількості білків глобулінових фракцій, показник білкового індексу зростає. Для гемолімфи та мантиї відзначено спорідненість дії Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , а за токсичним ефектом — близькі до Cr^{3+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} . У гепатопанкреасі близькими за регуляторним ефектом є Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} та Pb^{2+} , а за токсичним ефектом — Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} .

Одним із критичних екоотоксикологічних чинників гідроєкосистем внутрішніх водойм є сполуки важких металів (ВМ). Їх особливість полягає в здатності до перерозподілу в організмах як на тканинному, так і на клітинному рівнях незалежно від шляху надходження. Цим пояснюється наявність у клітинах гідробіонтів значної кількості переносників ВМ, насамперед білків [1, 2]. Крім того, для цих іонів характерним є вияв прямої токсичності (дія на молекули-мішені), а також утворення вторинних токсикантів, зокрема неспецифічних інтермедіатів, які за принципом каскадно-ланцюгового механізму призводять до порушення низки обмінних процесів та метаболізму в цілому, а отже, викликають порушення гомеостазу [3]. При цьому зазначено й порушення метаболізму білків.

Вивчення впливу ВМ на зміни білкового складу окремих тканин прісноводних молюсків проводили вибірково на певних видах при дії окремих металів [4], хоча дослідити зміни метаболізму білків важливо, оскільки вони, як одні з основних, беруть участь у формуванні адаптивних реакцій [5]. Саме тому метою дослідження автора даного повідомлення був порівняльний аналіз вмісту деяких метаболітів білкового обміну (альбумінів, глобулінів та показника білкового індексу) у різних тканинах та органах неінвазійної витушки пурпурної при дії низьких летальних концентрацій (ЛК₂₅⁴⁸) різнотипних катіонів: Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} .

Матеріал та методи дослідження. Об'єкт дослідження — 162 екз. *Planorbarius purpura* (Müller, 1774), зібраних у червні — серпні 2002–2004 рр. у басейні р. Тетерів біля м. Житомир. Тварин контрольної групи (по 10 екз.) утримували в акваріумах (5 л) у дехлорованій водопровідній воді (рН 7,3–7,7; температура 18–20 °С; вміст кисню 7,0–8,2 мг/дм³). Для уникнення взаємного токсичного впливу катіона й аніона використано такі солі: $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $CrCl_3 \cdot 6H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$,

PbCl₂, ZnCl₂ марки “ч. д. а.”. Концентрацію токсиканту розраховували на катіон. Для дослідів брали ЛК токсиканту, що викликали 25% загибель особин (експозиція 48 год). У ході досліджень, щоб уникнути впливу біотичного фактора, використовували лише неінвазійні особини.

Для дослідів відбирали гемолімфу, гепатопанкреас і мантию. Гемолімфу отримували за методикою Таргетта в модифікації Стадниченко [6] безпосередньо перед дослідженням. Зважували моллюски та органи на електронних вагах WPS 1200/С.

Вміст альбумінів визначали за методикою [7], глобулінів — за методикою Маклагена і обчислювали в одиницях — SH. Білковий індекс розраховували за співвідношенням альбумін/глобулін. Всього виконано 2448 дослідів у трикратній повторюваності. Інтенсивність забарвлення кінцевих продуктів у всіх випадках визначали фотометрично на КФК-3; кількісний вміст іонів ВМ — за допомогою атомно-адсорбційного спектрофотометра С-115М з полум'яним аналізатором (стандарт СЕВ 5346). Отримані результати піддавали статистичній обробці за загальноприйнятою методикою з використанням *t*-критерію Стьюдента. Для багатовимірної аналізу використано програму STATISTICA 6.0

Результати дослідження та їх обговорення. Річка Тетерів за гідрохімічним складом катіонів характеризується високим природним вмістом мангану й феруму, що перевищує у 1,5–4 рази гранично-допустиму концентрацію (ГДК) (табл. 1). Це спричинило формування у моллюсків довготривалої адаптації до підвищеного вмісту вказаних іонів, що позначилося на відповідних значеннях ЛС₂₅⁴⁸, отриманих за результатами лабораторних токсикологічних експериментів. Слід зазначити високу адаптованість моллюсків (на основі ЛС₄₈²⁵) до Co²⁺, Cr³⁺, Zn²⁺ та високу чутливість до Cu²⁺ і до небіогенних катіонів Pb²⁺, Cd²⁺. Разом з тим у кожному випадку зрозуміло таке: іони стосовно тварин, гідробіонтів зокрема, мають значну біологічну активність, оскільки є мікроелементами широкого спектра дії.

Манган активує багато ферментативних процесів, включно окремі ферменти у циклах ди- й трикарбонових кислот, забезпечує еритропоез та утворення гемоглобіну, впливає на засвоєння іонів купруму, на ріст, розмноження тварин та на імуностійкість організму [9]. Ферум міститься у структурі гемоглобіну та каталізує обмінні процеси [9]. Кобальт є незамінним іоном, що входить до складу вітаміну В₁₂, реактивує лужну фосфатазу, бере участь у обміні амідів, нуклеїнових кислот, прискорює перенесення аміноацил-т-РНК до рибосом, впливає на дихання і енергетичний обмін та активує синтез жирних кислот [9]. Хром (III) —

Таблиця 1. Основні токсикологічні показники досліджених катіонів

Катіон	ГДК		ЛС ₂₅ ⁴⁸ , мг/дм ³	Вміст у р. Тетерів, мг/дм ³
	санітарно-гігієнічні, мг/дм ³ , за [8]	рибогосподарські, мг/дм ³ , за [8]		
Mn ²⁺	0,1	0,01	250	0,351 ± 0,144
Co ²⁺	0,1	0,01	250	—
Fe ³⁺	0,3	0,10	25	0,488 ± 0,095
Cr ³⁺	0,5	0,005	25	0,002 ± 0,0001
Cu ²⁺	1,0	0,001	0,01	0,071 ± 0,026
Cd ²⁺	0,001	0,0005	1,0	—
Pb ²⁺	0,03	0,01	0,5	0,018 ± 0,002
Zn ²⁺	1,0	0,01	25	0,143 ± 0,069

Примітка. Риска — показники відсутні.

есенціальний мікроелемент, який регулює перебіг вуглеводного обміну завдяки фактору толерантності до глюкози [10]. Купрум міститься у ферментах (цитохромоксидазі, діамінооксидазі, уратоксидазі, сульфідтрансферазі тощо) та купрумвмісних білках, діє на процеси тканинного дихання, кровотворення, сперматогенезу, синтезу фосфоліпідів, фенольного обміну, слугує каталізатором окисно-відновних реакцій, впливає на структуру та функції нуклеїнових кислот [10]. Цинк входить до складу карбоангідраз, дегідрогеназ, фосфатаз, протейназ, пептидаз і ферментів нуклеїнового обміну, відіграє істотну роль у механізмах спадковості через участь у стабілізації рибосом і біополімерів. Від кількості цинку в організмі залежать особливості перебігу в м'язовій тканині гліколітичних та окиснювальних процесів [9]. Для металів, які не виконують в організмі фізіологічні функції (кадмій, плумбум), відзначається невисокий рівень регуляції їх надходження [10]. Відомо [11], що кадмій — антагоніст іона цинку, що призводить до заміщення останнього в біологічних структурах та до порушення ензиматичних процесів. Отже, слід очікувати значного впливу досліджених катіонів на вміст метаболітів білкового обміну.

Встановлено, що при дії іонів мангану й феруму вміст альбумінів у гемолімфі на 22,7–37,9% нижчий, ніж у тварин контрольної групи, а при дії іонів кобальту й кадмію — знаходиться в межах показників контрольної групи тварин (рис. 1). Іони хрому (III), купруму, плумбуму й цинку збільшують концентрацію альбумінів на 21,1–116,1%. Для глобулінів гемолімфи при дії практично всіх іонів характерне зменшення показників на 71,4–85,2%. Виключення становлять іони кобальту, феруму і мангану, вплив яких спричинюють лише тенденції до зменшення показників. Іони за значенням білкового індексу можна поділити на дві групи: перша — Mn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} не викликала статистично достовірних змін показника у дослідних тварин, однак іони мангану й феруму дещо знижують (на 21,1–31,9%) його значення, а іони кобальту збільшують на 10,2%; друга — Cr^{3+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} призвела до збільшення цього показника в 4,8–11,5 раза.

Зазначені ефекти іонів металів для гемолімфи контрольних тварин можна навести такими рядами:

альбуміни: $Mn^{2+} < Fe^{3+} < \text{контроль} < Co^{2+} < Cd^{2+} < Cr^{3+} < Cu^{2+} < Pb^{2+} < Zn^{2+}$;
 глобуліни: $Cr^{3+} < Pb^{2+} < Cd^{2+} < Cu^{2+} < Zn^{2+} < Co^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{3+} < \text{контроль}$;
 білковий індекс: $Mn^{2+} < Fe^{3+} < \text{контроль} < Co^{2+} < Cd^{2+} < Cu^{2+} < Cr^{3+} < Pb^{2+} < Zn^{2+}$.

У гепатопанкреасі дослідних молюсків (порівняно з контрольною групою) вміст альбумінів зростає при дії всіх іонів у 1,2–10,3 раза. Іони Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} зменшують вміст глобулінів на 47,8–71,0%; при дії іонів Cr^{3+} , Pb^{2+} , Co^{2+} спостерігається зростання даного показника на 29,1–52,4%. Іони Fe^{3+} й Mn^{2+} не викликають статистично достовірних змін вмісту глобулінів. Показники білкового індексу для іонів мангану й феруму знаходяться в межах норми (0,647 та 0,493). Решта іонів призводить до його збільшення в 2,0–31,4 раза. Для гепатопанкреасу дію іонів ВМ можна навести такими рядами:

альбуміни: $\text{контроль} < Fe^{3+} < Mn^{2+} < Co^{2+} < Pb^{2+} < Cr^{3+} < Zn^{2+} < Cd^{2+} < Cu^{2+}$;
 глобуліни: $Cd^{2+} < Zn^{2+} < Cu^{2+} < \text{контроль} < Mn^{2+} < Fe^{3+} < Co^{2+} < Pb^{2+} < Cr^{3+}$;
 білковий індекс: $Fe^{3+} < \text{контроль} < Mn^{2+} < Co^{2+} < Pb^{2+} < Cr^{3+} < Cu^{2+} < Cd^{2+} < Zn^{2+}$.

У мантиї вміст альбумінів при дії всіх досліджених іонів зростає в 1,3–4,2 раза. Для глобулінів характерне зменшення показників при дії іонів Cr^{3+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} на 69,9–86,1%, а для іонів Mn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} — збільшення показників на 44,2–124,1%. За білковим індексом досліджені іони чітко можна поділити на дві групи: Mn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} не викликають статистично достовірних змін показника, проте спостерігається тенденція до його зниження на 19,6–26,6%; Cr^{3+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} збільшують значення білко-

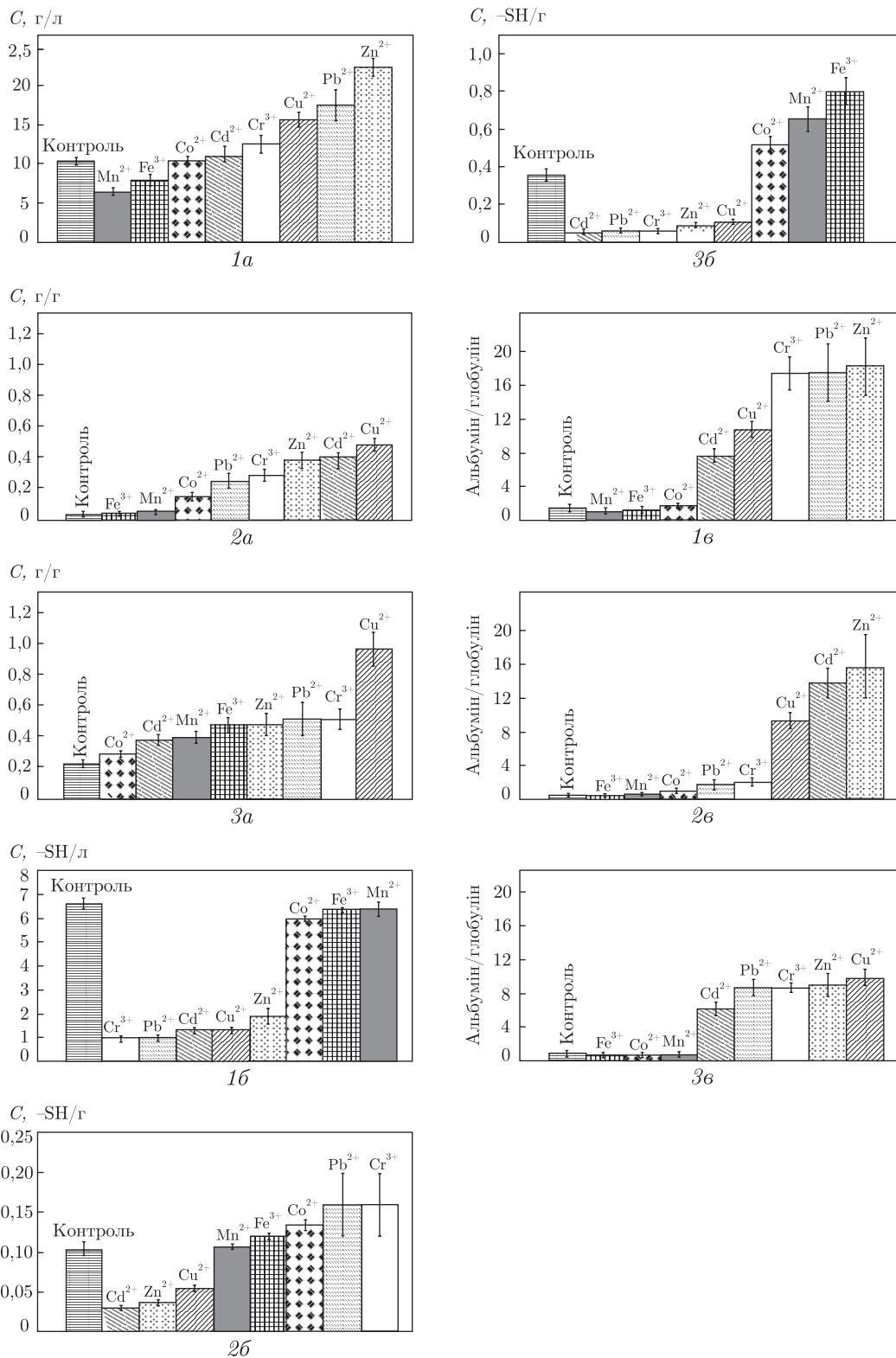


Рис. 1. Вміст окремих метаболітів у тканинах та органах *P. purpura* при дії різних іонів важких металів (LC₂₅) (1 — гемолімфа; 2 — гепатопанкреас; 3 — мантия; а — альбуміни; б — глобуліни; в — білковий індекс

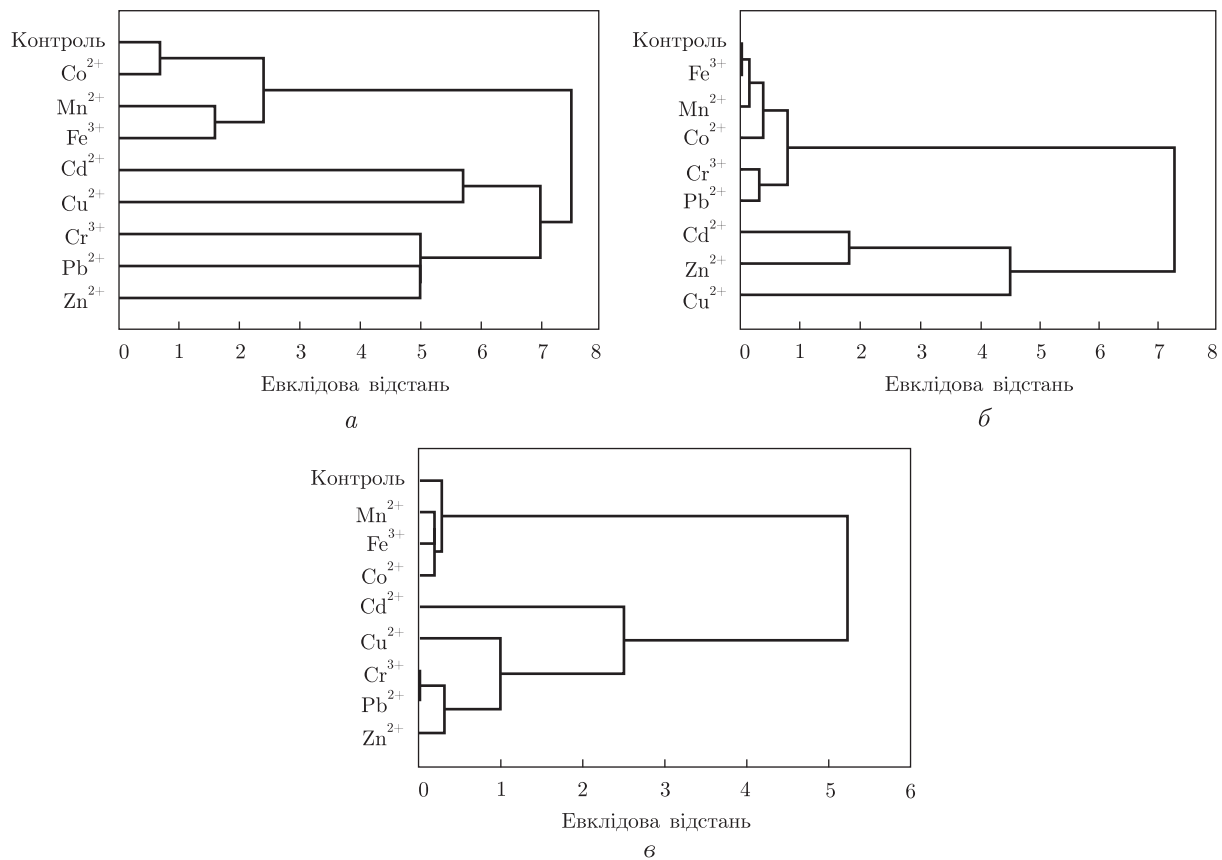


Рис. 2. Дендрограма подібності впливу катіонів на показники білкового обміну в організмі *P. purpura*: а — гемолімфа; б — гепатопанкреас; в — мантія

вого індексу в 7,4–11,8 раза. Зазначені ефекти іонів металів у мантії можна навести такими рядами:

альбуміни: контроль < Co^{2+} < Cd^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{3+} < Zn^{2+} < Pb^{2+} < Cr^{3+} < Cu^{2+} ;
глобуліни: Cd^{2+} < Pb^{2+} < Cr^{3+} < Zn^{2+} < Cu^{2+} < контроль < Co^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{3+} ;
білковий індекс: Fe^{3+} < Co^{2+} < Mn^{2+} < контроль < Cd^{2+} < Pb^{2+} < Cr^{3+} < Zn^{2+} < Cu^{2+} .

Отримані результати можна пояснити особливостями обмінних процесів у молосків. Основна функція мантії — це синтез черепашки. Цей процес відбувається лише при достатній кількості аміаку, який, виділяючись мантією, зв'язується з гідрокарбонат-іонами з подальшим вивільненням карбонат-іонів, що, в свою чергу, є матеріалом для синтезу черепашки [12]. Білки, як джерело аміаку, вивільняють останній за рахунок дезамінування.

Характерне для гепатопанкреасу збільшення вмісту альбумінів можна пояснити виключно довготривалими стрес-адаптаційними змінами в організмі витушок.

Комплексний аналіз отриманих даних дає змогу на основі ефектів катіонів виділити дві їх групи (рис. 2). Для регуляторних ефектів у гемолімфі та мантії відзначено спорідненість дії Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , а за токсичним ефектом — близькими є Cr^{3+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} . Щодо гепатопанкреасу, то спостерігається інша тенденція. Близькими за регуляторним ефектом є Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} й Pb^{2+} , а за токсичним ефектом — Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} .

Метаболічні ефекти ВМ є результатом їх взаємодії з білками. Одним із основних чинників, що визначає спорідненість органічних молекул до іонів металів, є хелатний ефект [13]. Він залежить від радіуса іона металу та ступеня його гідратації у водних розчинах. Виокремлення груп металів у цьому досліді за біологічним ефектом щодо білків *P. purpura* не співвідноситься з величиною іонного радіуса досліджених металів, оскільки іони Mn^{2+} , Fe^{3+} й Co^{2+} мають іонні радіуси відповідно 0,080, 0,064 та 0,074 нм; Cu^{2+} — 0,072 нм; Zn^{2+} — 0,074 нм; Cd^{2+} — 0,097 нм [13]. За гідратаційними властивостями, великі та менші гідратовані іони металів зв'язуються з лігандами міцніше, ніж менші та сильно гідратовані іони. Ряд металів за цією здатністю представимо так: $Mn^{2+} < Co^{2+} < Cd^{2+} < Cu^{2+} < Zn^{2+} < Cr^{3+} < Fe^{3+} < Pb^{2+}$ [13]. У нашому досліді за подібністю впливу на показники білкового обміну молюсків виявляється спорідненість іонів саме за цим принципом — більшою метаболічною активністю стосовно впливу на вміст альбумінів у всіх досліджених тканинах, глобулінів у гепатопанкреасі та мантиї і показник білкового індексу мали іони з більшою хелатуючою здатністю. Найбільшою чутливістю характеризуються білки гемолімфи, що пояснюється високою доступністю до них іонів металів та лабільністю самих білків.

Стосовно метаболічних наслідків таких взаємодій, зміни вмісту білків у клітині насамперед пов'язані із співвідношенням інтенсивності їх синтезу та катаболізму. Відомим є факт, що іони свинцю є потужними інгібіторами ферментів білкового синтезу. При токсичному стресі посилюється катаболізм білків внаслідок їх використання як енергетичних субстратів [14] та за рахунок порушення токсикантами структурно-функціональної цілісності функціональних форм білків, зростання помилок у процесі синтезу і походження посттрансляційних модифікацій, що спостерігається також й у гідробіонтів. Зміна загального вмісту білків у сироватці крові може мати місце внаслідок формування стресових реакцій, при яких продукуються захисні білки, здатні хелатувати та переносити токсичні іони, наприклад металотіонеїни [15].

Вплив досліджених іонів на білки молюсків у кожній з досліджених тканин є багатовекторним і має загальний регуляторно токсичний принцип дії. Насамперед, він відзначається зростанням вмісту альбумінів, здатних ефективно зв'язувати ці іони, та зменшенням кількості білків глобулінових фракцій. Внаслідок цього у бік зростання змінюється показник білкового індексу.

Результатами проведених досліджень встановлено високу реакційну здатність білкової системи молюсків, спрямовану на підтримання адаптивного рівня функціонування організму, при дії іонів важких металів. Зміна загального вмісту білків, а також співвідношення білкових фракцій свідчать про певні компенсаторні або патологічні зміни в органах та тканинах, які беруть участь у синтезі та катаболізмі цих білків при інтоксикації організму молюсків іонами ВМ.

1. Durr G., Strayle J. The medial-Golgi Ion Pump Pmr1 Supplies the Yeast Secretory Pathway with Ca^{2+} and Mn^{2+} Required for Glycosylation, Sorting, and Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation // Mol. Biol. Cell. – 1998. – 9. – P. 1149–1162.
2. Paidhungat M., Garrett S. Cdc1 and the vacuole coordinately regulate Mn^{2+} homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. – 1998. – 148. – P. 1787–1798.
3. Куценко С. А. Основы токсикологии. – Санкт-Петербург: Б. и., 2002. – 818 с.
4. Стадниченко А. П., Киричук Г. Е. Влияние трематодной инвазии и сульфата хрома на содержание общего белка в гемолимфе *Viviparus viviparus* (Mollusca : Gastropoda : Pectinibranchia) // Паразитология. – 2002. – 36, вып. 3. – С. 240–246.
5. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. – Москва: Мир, 1988. – 568 с.

6. Стадниченко А. П. Изменения белкового спектра крови *Viviparus contectus* (Millet, 1813) (*Gastropoda, Prosobranchia*) при инвазии личиночными формами трематод // Паразитология. – 1970. – № 5. – С. 484–488.
7. Горячковский А. М. Справочное пособие по клинической биохимии. – Одесса: ОКФА, 1994. – 415 с.
8. Гусева Т. В., Молчанова Я. П., Заша Э. А., Виниченко В. Н., Аверочкин Е. М. Гидрохимические показатели состояния окружающей среды. – Москва: Эколайн, 2000. – 127 с.
9. Горювая С. Л., Столярова С. А. Физиолого-биохимические показатели рыб водоемов Белоруссии. – Минск: Наука и техника, 1987. – 157 с.
10. Мур Дж., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах. – Москва: Мир, 1987. – 288 с.
11. Кадмий // Научные обзоры советской литературы по токсичности и опасности химических веществ: Сб. – Москва: Б. и., 1984. – Вып. 69. – 59 с.
12. *Біохімія: еволюційна і порівняльна* / М. Є. Кучеренко, О. Ю. Пащенко, З. Й. Фарбі. – Київ: Либідь, 1996. – С. 126–135.
13. Мецлер Д. Биохимия. – Москва: Мир, 1980. – Т. 1. – С. 266–267.
14. Millward D. J., Bates P. C., Broun J. G. The regulation of protein catabolism in skeletal muscle in vivo // *Wiss. Beitr. M. Luther Univ. Halle-Wittenberg.* – 1981. – 66. – P. 28.
15. Смольский А. С., Смольская Т. М. Посттрансляционные модификации белков крови рыб при действии ионов тяжелых металлов // Укр. біохім. журн. – 2002. – 74, № 46 (2). – С. 103.

*Житомирський державний університет
ім. Івана Франка*

Надійшло до редакції 20.05.2008

G. Ye. Kurychuk

The protein content in the tissues of *Planorbarius purpura* (*Mollusca : Gastropoda : Pulmonata : Bulinidae*) under the influence of metal ions

*The influence of heavy metals (Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+}) in low concentrations (LC_{25}^{48}) on the content of some protein exchange metabolites (albumins, globulins) and the protein index in the hemolymph, hepatopancreas, and mantle of noninvaded *Planorbarius purpura* is investigated. It is established that the influence of these ions on proteins in all researched tissues is multivectorial and has the regulating and toxic effects. It is characterized by an increase of the albumin content, a decrease of globulin fractions' proteins, and an increase of the protein index. In hemolymph and mantle, the effects of Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} are similar; and Cr^{3+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} are similar in the toxic effect. In hepatopancreas, Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} and Pb^{2+} are similar in the regulating effect, whereas Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} are similar in the toxic effect.*