

БІЛКОВО-НУКЛЕЇНОВИЙ ОБМІН В ТКАНИНАХ КОРОПА ПІД ВПЛИВОМ МАРГАНЦЮ, ЦИНКУ ТА МІДІ.

Сполуки металів відіграють важливу роль в життєдіяльності всіх організмів, в тому числі і гідробіонтів. Входячи до складу багатьох органічних речовин, або вступаючи з ними у взаємодію, вони впливають на перебіг багатьох біохімічних процесів. Іони важких металів здатні утворювати в живих тканинах міцні зв'язки з різними біологічно активними центрами, зокрема із сірковмісними лігандами, джерелом яких можуть бути білки та низькомолекулярні пептиди. В значній мірі ця дія пов'язана з ферментами, які містять у своєму складі іони металів, або активуються ними.

Як мікроелементи, метали впливають на виконання білками їх різноманітних функцій, на інформаційну здатність нуклеїнових кислот та на інші біохімічні процеси. Такий вплив може бути стимулюючим, пригнічуючим або нейтральним, залежно від природи металу, концентрації та форми його існування у воді.

Заслуговує уваги вивчення дії на метаболічні процеси в організмі риб іонів таких металів як марганець, цинк та мідь. Так, марганець активує ДНК- та РНК-полімеразу, рибо- і дезоксирибонуклеазу, цинк входить до складу важливих ферментів білкового обміну (пептидази, глутаматдегідрогенази), він стимулює ріст тварин шляхом впливу на клітинний синтез РНК. Мідь впливає на структуру і функції нуклеїнових кислот, а також на активність ферментів енергетичного обміну, зокрема АТФ-ази.

Оскільки дані елементи тісно зв'язані з обміном білків та нуклеїнових кислот, метою даної роботи було вивчення їх впливу на вміст вищевказаних біополімерів в тканинах коропа – важливого промислового виду прісних водойм. Проведені дослідження направлені на пошук способів підвищення рибопродуктивності шляхом застосування мікроелементів як біологічно активних сполук.

Досліди проводилися на коропах двоохрічного віку. Риби із середньою масою 250-300 г поміщали в 200 л акваріуми, при температурі води 12°C. Дослідні групи перебували у воді, де концентрація іонів міді, цинку і марганцю, введених у вигляді хлоридів, складала 0,5 мг/л. Контрольна група утримувалася в таких же умовах, тільки без додавання вищевказаних мікроелементів. Через сім днів риби забивали і брали проби тканин для аналізу.

Нуклеїнові кислоти визначали спектрофотометричним методом [10], приймаючи до уваги рекомендації інших авторів [2].

Вміст загального білка в тканинах риб визначали біуретовим методом [1] з деякими змінами [6], а білку у фракціях нуклеїнових кислот – за методом Лоурі [13].

Про метаболічну активність білково-нуклеїнового обміну в тканинах риб судили по відношенню між кількістю нуклеїнових кислот і кількістю зв'язаного з ними білку. При цьому нами були використані наступні показники: РНК:білок цієї фракції ($\times 10^{-3}$) – «РНП-число», ДНК:білок цієї фракції ($\times 10^{-3}$) – «ДНП-число». Згідно літературних даних [5] «РНП-число» добре узгоджується з інтенсивністю біосинтезу білка, а «ДНП-число» свідчить про інтенсивність синтезу нуклеїнових кислот.

Весь одержаний цифровий матеріал опрацювали статистично [7].

Дослідами в акваріальних умовах показано, що при семидобовій аклімації риб до вмісту у воді марганцю, цинку та міді в концентрації 0,5 мг/л змінюється в їх тканинах

вміст нуклеїнових кислот та білків, а також міняється метаболічна активність цих тканин.

Так, зокрема, при вивченні впливу іонів важких металів на концентрацію нуклеїнових кислот (таблиця 1) відзначено збільшення вмісту РНК в печінці в результаті дії марганцю та міді, причому більш значні зміни наступали в результаті дії марганцю. Цинк приводив до зменшення кількості РНК в цьому органі. В м'язах, як і в крові, збільшення кількості РНК наступало в результаті дії іонів цинку та міді, а марганець зумовлював зменшення кількості цієї кислоти, особливо в крові.

З одержаних даних видно, що існує певний зв'язок між іонами досліджуваних металів та обміном РНК. В роботі [11] обговорюються можливі механізми інгібування активності рибонуклеази під дією міді та цинку. Показано також [3], що низькі концентрації свинцю в сім'яниках білих щурів знижують активність рибонуклеаз. При цьому обмін РНК мітохондрій знижується, але збільшується вміст РНК в ядерній фракції, супернатанті і гомогенаті тканини.

При нестачі цинку вміст РНК в тканинах знижується [12], що свідчить про те, що іони цинку стабілізують молекулу РНК проти дії рибонуклеаз. Це підтверджується і результатами наших досліджень, в яких оптимальна доза цинку пригнічує дію рибонуклеаз. Особливо чітко це явище спостерігається в крові.

Таблиця 1.

Вплив важких металів на вміст нуклеїнових кислот в тканинах коропа (мг % Р, $M \pm m$, n = 5)

Група риб	РНК	ДНК	РНК/ДНК
ПЕЧІНКА			
Контроль	70,47 ± 3,73	35,75 ± 1,05	1,97 ± 0,11
Марганець	84,62 ± 6,78	32,00 ± 2,30	2,64 ± 0,37
Цинк	62,32 ± 3,82	37,50 ± 3,95	1,66 ± 0,14
Мідь	73,47 ± 5,30	34,72 ± 3,12	2,12 ± 0,25
М'ЯЗИ			
Контроль	13,47 ± 0,45	9,12 ± 0,57	1,50 ± 0,07
Марганець	12,62 ± 0,28	7,50 ± 0,67	1,68 ± 0,17
Цинк	15,60 ± 0,52	9,00 ± 0,41	1,73 ± 0,07
Мідь	14,11 ± 0,40	8,25 ± 0,52	1,71 ± 0,12
КРОВ			
Контроль	16,12 ± 1,68	59,00 ± 6,24	0,27 ± 0,04
Марганець	11,22 ± 1,51	67,00 ± 5,00	0,17 ± 0,02
Цинк	21,74 ± 0,07	65,00 ± 3,70	0,33 ± 0,01
Мідь	16,48 ± 1,10	66,00 ± 4,35	0,25 ± 0,02

Стосовно ДНК, то кількість цієї кислоти в печінці зменшується під дією марганцю і дещо зростає в результаті дії цинку. Іони міді практично не приводять до зміни концентрації ДНК. В м'язевій тканині відмічена тенденція до зменшення кількості ДНК в результаті дії всіх досліджуваних металів, а в крові навпаки – спостерігали збільшення концентрації цієї кислоти під дією марганцю, цинку та міді.

Одержані дані узгоджуються з літературними, які свідчать про те, що цинк стимулює синтез ДНК в ядрах клітин печінки [18]. В той же час синтез ДНК може бути загальмований при інкубації ядер клітин печінки безпосередньо в розчинах солей цинку. Тому можливо, що дія цинку при синтезі ДНК починається на більш ранніх етапах.

Не виключено, що певну роль в обміні нуклеїнових кислот відіграють також іони міді, оскільки є дані про існування комплексу ДНК-мідь [14].

Іони металів, зв'язуючись з фосфатними групами або основами ДНК, впливають на електронні взаємодії і створюють конформаційні перебудови, необхідні для зв'язування

білкових молекул, і таким чином впливають на активність локусів геному [15]. Точність синтезу ДНК визначається металічними іонами-активаторами [17]. При цьому існує тканинна специфічність зв'язування мікроелементів з ДНК. Вони сприяють стабілізації подвійної спіралі ДНК, причому вплив іонів двовалентних металів проявляється при значно нижчих концентраціях, ніж одновалентних [16].

В результаті дії важких металів в досліджуваних тканинах змінюється і співвідношення РНК/ДНК. В печінці воно збільшується під дією марганцю та міді, в крові – цинку, а в м'язах спостерігається тенденція до збільшення цього показника під дією всіх вивчених металів.

Збільшення співвідношення РНК/ДНК згідно автора [4] свідчить про зростання активності синтезу рибонуклеїнових кислот в досліджуваному органі, а зменшення його – навпаки, про сповільнення цього процесу.

При вивченні впливу іонів важких металів на різні форми білку (табл.2) також виявлені деякі зміни у вмісті цих біополімерів. Зокрема, при постійному вмісті загального білку в печінці виявлено збільшення цього показника в м'язах в результаті дії цинку, міді і особливо марганцю. Зростання концентрації загального білка під дією марганцю спостерігали і в крові дослідних риб, що свідчить про певну роль цього металу в процесі синтезу білка, зокрема в забезпеченні стійкості рибосом [9].

Таблиця 2.

Вплив важких металів на вміст білків в тканинах коропа
(мг %, $M \pm m$, $n = 5$)

Група риб	Загальний білок	Білок РНК	Білок ДНК
ПЕЧІНКА			
Контроль	10,39 ± 0,34	4,93 ± 0,16	0,14 ± 0,04
Марганець	10,88 ± 0,44	5,24 ± 0,21	0,99 ± 0,02
Цинк	10,53 ± 0,95	3,94 ± 0,19	1,10 ± 0,01
Мідь	10,70 ± 0,69	4,59 ± 0,20	1,04 ± 0,02
М'ЯЗИ			
Контроль	14,97 ± 0,84	6,68 ± 0,19	1,44 ± 0,03
Марганець	16,94 ± 0,14	7,77 ± 0,22	1,42 ± 0,07
Цинк	15,16 ± 0,56	5,87 ± 0,11	1,40 ± 0,02
Мідь	16,05 ± 0,35	6,82 ± 0,16	1,41 ± 0,04
КРОВ			
Контроль	14,83 ± 0,79	4,20 ± 0,18	1,22 ± 0,09
Марганець	15,73 ± 0,62	4,58 ± 0,27	1,21 ± 0,07
Цинк	13,30 ± 0,06	3,62 ± 0,24	1,22 ± 0,07
Мідь	14,50 ± 0,64	4,10 ± 0,23	1,21 ± 0,07

Певний інтерес становить вивчення вмісту в тканинах білку, зв'язаного з нуклеїновими кислотами, тобто визначення кількості білку в гідролізатах РНК і ДНК [5,8].

При визначенні білків у фракціях нуклеїнових кислот (таблиця 2) практично не виявлено змін в концентрації білка ДНК у всіх досліджуваних тканинах. Щодо білка РНК, то тут ми спостерігали збільшення цієї форми біополімеру в печінці, м'язах та крові під дією марганцю і зменшення під дією цинку. Іони міді практично не впливали на цей показник.

Потрібно відзначити також те, що більша частина білка в тканинах риб зв'язана з фракцією РНК. У фракції ДНК білка значно менше.

Поряд з вивченими показниками ми проаналізували і певні їх співвідношення, які можуть служити показниками метаболічної активності досліджуваних тканин. При цьо-

му нами використані такі співвідношення: РНК: білок цієї фракції ($\times 10^3$) та ДНК: білок цієї фракції ($\times 10^3$). Як показали наші дослідження, а також роботи інших авторів [5,8], перше співвідношення дає інформацію про активність процесів біосинтезу білку, а друге добре узгоджується з інтенсивністю синтезу нуклеїнових кислот.

Одержані дані представлені у вигляді діаграм 1 і 2. З них видно, що величина «РНП-числа» в печінці (діаграма 1) зростає під дією всіх досліджуваних металів. Дещо більші зміни в цьому показнику відмічено під впливом марганцю. В м'язах марганець навпаки приводить до зменшення величини «РНП-числа» в порівнянні з контролем, і лише цинк збільшує цей показник у цій тканині. При дії міді відхилень від контролю в м'язах не відмічено.

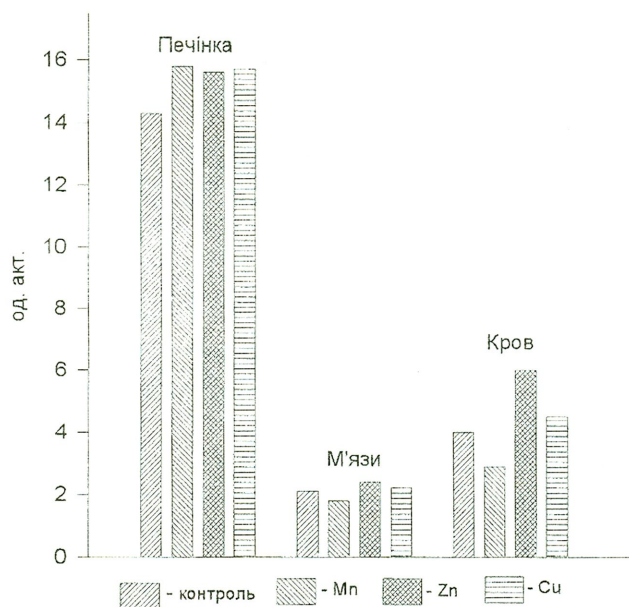
В крові досліджуваних риб значно зменшується величина «РНП-числа» під дією марганцю і так само збільшується під дією цинку. Іони міді не приводять до відхилень цього показника від контролю.

При вивченні впливу важких металів на величину «ДНП-числа» (діаграма 2) нами відзначено збільшення цього показника в печінці і крові досліджуваних риб під дією всіх елементів. Найбільші зміни спостерігалися в печінці в результаті дії цинку та в крові під дією марганцю.

Менші зміни величини «ДНП-числа» відмічені в м'язах. В цій тканині тільки цинк дещо збільшував величину цього показника, в той час як марганець та мідь знижували її. Взагалі треба відмітити, що в м'язах спостерігається найнижча метаболічна активність, в той час як в печінці вона проходить на значно вищому рівні, що свідчить про високу функціональну активність цього органу.

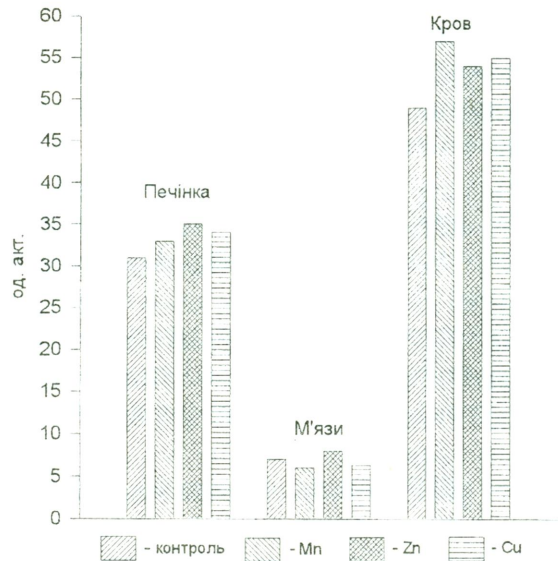
Діаграма 1

Зміна величини «РНП-числа» в тканинах коропа під впливом важких металів (умовні тести, одиниці активності)



Дані, одержані з допомогою застосованих тестів, дають змогу стверджувати, що співвідношення нуклеїнових кислот і білків більш точно характеризують білково-нуклеїновий обмін в тканинах, ніж показники окремих компонентів. У біохімічному відношенні використані тести характеризують взаємовідношення окремих компонентів в нуклеопротеїдних комплексах, що добре узгоджується з умовами підтримання структури та функціонального стану вказаних біополімерів.

Зміна величини «ДНП-числа» в тканинах коропа під впливом важких металів (умовні тести, одиниці активності)



Таким чином, на основі одержаних даних можна зробити висновок про те, що іони марганцю, цинку та міді, введені в воду в біогенних кількостях, здійснюють позитивний вплив на білково-нуклеїновий обмін в тканинах коропа. Тому сполуки цих металів можна рекомендувати для використання в практиці рибництва з метою підвищення продуктивності прісних водойм.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бейли Д. Методы химии белков. – М.: Мир, 1965. – С. 266.
2. Галкин В.В., Бердышев Г.Д. К вопросу о количественном определении нуклеиновых кислот биохимическими методами в тканях различных животных // Биохимия. – 1968. – 33, N 1. – С. 66-76.
3. Голубович Е. Я., Орлянская Р. Л. Влияние свинца на активность обмена РНК в клеточных фракциях семенников белых крыс // Токсикология новых промышленных химических веществ. – М.: Медицина, 1975. – Вып. 14. – С. 22-26.
4. Зуссман М. Биология развития. – М.: Мир, 1977. – 301 с.
5. Калачнюк Г. И. Белоксинтезирующая способность слизистой рубца и ее биологическая роль. – Львов, 1974. Дис. на соиск. учен. степ. д-ра биол. наук. – 370 с.
6. Калачнюк Г.И., Гжицький С.З. Визначення концентрації білка у вмісті рубця за принципом виявлення пептидних зв'язків // ДАН УРСР. – 1974. – Б, N 4. – С. 353-355.
7. Ойвин И.А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований // Пат. физиол. и экспер. терапия. – 1960. – 4, N 4. – С. 75-81.
8. Серсенов А. С. О количественном определении белка в пробе ткани, использованной для экстрагирования нуклеиновых кислот. – Тр. ин-та экспер. биол. АН Каз. ССР, 1977. – Вып. 12. – С. 127-129.
9. Спирин А. С., Гаврилова Л. П. Рибосома. – М.: Наука, 1971. – 254 с.
10. Цанев Р.Г., Марков Г.Г. К вопросу о количественном спектрофотометрическом определении нуклеиновых кислот // Биохимия. – 1960. – 25, N 1. – С. 151-159.
11. Breslow E., Giratti A. W. The interaction of ribonuclease with metal ions. I. Studies of cupric and zinc ions and the effect of cytidylic acid. // J. Bich. Chem., – 1966. – 241, N 23. – P. 5651-5660.

12. Holt A. B., Mellits E. D., Cheek D. B. Comparisons between nucleic acids proteins zinc and manganese in rat liver: a relation between zinc and ribonucleic acid. // *Pediat. Res.*, – 1970. – 4. – P. 157-164.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.G., Tarr A.L., Randall R. C. Protein measurement with the Folin phenol reagent. // *J. Biol. Chem.* – 1951. – 193, N 1. – P. 265-275.
14. Prasal Z. Physicochemical investigations of DNA copper complexes. Part I. Determination of composition of copper complexes on the basis of oscillographic curves at PN 4,9-5,7. – // *Rocz. Chem.*, – 1975. – 49, N 3. – P. 455-466.
15. Sissioeff J., Zrisverd J. Studies of metal ions- DNA interactions: specific behavior of DNA sequences. // *Progr. Biophys. and mol. Biol.* – 1976. – 31, N 2. – P. 165—199.
16. Shack J., Jenhins R. J., Thompsett J. M. The interaction of ions and desoxyntose nucleic acid of colb thymus. // *J. Bich. Chem.*, – 1953. – 203, N 1. – P. 373-387.
17. Sirver M. A., Loeb H. A. Metal activation of DNA synthesis. // *Biochem. and Bioptys. Res. Communs.* – 1976. – 70, N 3. – P. 812-817.
18. Weser V., Mocler H. DNA-Polymerase-aktivitat isolierter lebezzellkerue. Reaktivitat von Zn^{++} und Hg^{++} // *Z. Klen. chem.* – 1970. – 8, N 2. – P. 137-140.

*О. Б. Столяр, В. З. Курант, Л. С. Ільніцька,
В. Р. Дрель, Т.П. Нижник*

УДК 574.5:504.054

ВИВЧЕННЯ ЗДАТНОСТІ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ ІНАКТИВУВАТИ БІОМОЛЕКУЛИ.

Дослідження рівня забруднення середовища важкими металами та їх дії на живі організми складає актуальний і добре розвинутий напрямок сучасної хімічної технології. На підставі великого фактичного матеріалу, в ньому сформувався провідна ідея про значення форм знаходження металу для оцінки ступеня його токсичності [8]. Для металів істотне значення має ступінь окиснення, існування у вигляді комплексів різної природи, зв'язування у різні сполуки, зокрема метилювання [1,6]. У водоймах, на доступність металу для гідробіонтів, впливає кислотність середовища, розподіл металу між донними відкладами та рідкою фазою [1]. Таким чином, визначення абсолютного показника вмісту металу в середовищі не може адекватно характеризувати його небезпеку для організмів. Тому велика увага в науковій літературі приділяється пошуку біологічних тест-об'єктів, які б відображали стан організму в середовищі, забрудненому тим чи іншим металом.

Підбір чутливих біотестів визначається загальною метою дослідження. Так, для оцінки стану водної екосистеми в цілому, рекомендується використовувати аналіз показників фітопланктону [14]. Однак стан промислових видів риб за допомогою таких показників не може бути оцінений об'єктивно, так як існує видова специфічність накопичення металу в організмі та механізмів його детоксикації.

Відомо, що у водоростей іони кадмію, міді, цинку зв'язуються переважно з полісахаридами і нуклеїновими кислотами (цинк), а у мохів - з білками цитоплазми [3,23]. Безхребетні тварини акумулюють свинець та цинк у фосфатних гранулах, з яких при цьому конкурентно видаляється кальцій, тоді як кадмій зв'язується переважно у везикулах, багатих на сірку, ймовірно з металотіонеїнами [16,19]. Для деяких металів відкритий механізм індукції синтезу специфічних низькомолекулярних білків металотіонеїнів, які, наскільки відомо в наш час, не виконують ніякої іншої біологічної функції крім зв'язування надлишку металу в металсіркові комплекси [2]. Такі білки синтезуються в багатьох організмах, від одноклітинних до ссавців. Вважається, що у фізіологічних умовах вони зв'язують надлишок іонів цинку, що вивільняється при сповільненні темпів біосинтезу