

АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ СИСТЕМИ ГЛУТАТІОНУ В ЕРИТРОЦИТАХ КОРОПА ЛУСКАТОГО ЗА ДІЇ ПЛЮМБУМУ

М. Онисковець, к. б. н., Н. Лопотич, к. с.-г. н., О. Скаб, к. с.-г. н.

Львівський національний аграрний університет

<https://doi.org/10.31734/agronomy2018.02.145>

Постановка проблеми. Основним механізмом інтоксикації Плюмбумом є розвиток оксидативного стресу, на що вказує порушення в антиоксидантній системі (АОС) крові, як інтегрального показника стану організму. З огляду на це актуальним є з'ясування метаболічних ефектів Плюмбуму в еритроцитах крові, які одними з перших підпадають під вплив зміненого під дією токсикантів внутрішнього середовища організму, а також володіють потужною системою антиоксидантного захисту.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. На сьогодні вивченню впливу важких металів на метаболічні процеси в організмі водних тварин присвячено низку експериментальних праць. Проте розкриття механізмів формування адаптаційних реакцій неможливе без вивчення антиоксидантних систем, зокрема глутатіонзалежної, яка бере участь у біохімічних процесах захисту клітини за дії різноманітних стресових впливів. Крім супероксиддисмутази та каталази, існують інші ензими, яким належить не менша роль у нівелюванні шкідливої дії Плюмбуму. Зокрема, до них належать глутатіонпероксидаза (ГП) та глутатіонредуктаза (ГР) – ензими циклу глутатіону, яким відведена провідна роль у знешкодженні токсичного пероксиду гідрогену, що утворюється під час дії вільних радикалів [4].

Постановка завдання. Ми ставили за мету з'ясувати, як впливає Плюмбум на активність ензимів системи глутатіону в еритроцитах коропа лускатого – одного з прісноводних видів риб, який широко розповсюджений у водоймах Західної України.

Виклад основного матеріалу. Досліди проводили на коропках (*Cyprinus carpio* L.) дворічного віку в резервуарах об'ємом 200 л. До кожної експериментальної групи входило по 7 особин. Досліджували вплив на риб іонів Плюмбуму Pb^{2+} – 0,2; 0,5 та 5 мг/л, що відпо-

відають 2, 5 та 50 гранично допустимим концентраціям. Риб витримували в середовищі 96 годин. Здійснювали постійну аерацію і підтримували температурний режим води на рівні – 18–20 °С. Кров забирали за допомогою пастерівської піпетки зі серця риб. Гемолізат еритроцитів отримували згідно з Nishikimi N. et al. (1972).

Активність ГП в отриманих супернатантах із гемолізату визначали згідно з В. Paglia, W. Valentine. Принцип методу визначення активності ГП базується на спектрофотометричному вимірюванні у процесі реакції швидкості окиснення відновленого глутатіону (GSH) у присутності ГП та NADPH за зміною оптичної густини середовища (1 мкМ NADPH відповідає 1 мкМ глутатіону).

Активність ГР в отриманих супернатантах із гемолізату визначали згідно з J. C. Kaplan (1969). Принцип визначення активності ГР базується на вимірюванні швидкості зміни оптичної густини середовища у процесі відновлення окисненого глутатіону (GSSH) в присутності ензиму та NADPH (1 мкМ NADPH відповідає 1 мкМ GSSG). Результати статистично опрацьовували за допомогою програми Statistiek із використанням *t*-тесту Стьюдента.

Відомо, що одним з основних механізмів інтоксикації Плюмбумом є розвиток оксидативного стресу, про що свідчать порушення в про- та антиоксидантній системі крові як інтегрального показника стану організму. Однак характер впливу сполук Плюмбуму на стан АОС риб, зокрема коропа лускатого, недостатньо вивчено. Водночас показники АОС є високореактивними та інформативними, що важливо для тестування впливу інтоксикації на метаболічні процеси в організмі. Така інформація залишається актуальною і необхідною для оцінки стану здоров'я риб за моніторингу водних біоценозів.

Крім супероксиддисмутази та каталази, одним із ключових та найефективніших антиоксидантних механізмів є система глутатіону. Аналізуючи стан АОС, необхідно брати до уваги зміни,

які відбуваються у концентрації глутатіону та в активності пов'язаних із цим трипептидом ензимів – ГП та ГР. Як відомо, глутатіон у відновленій та окисненій формах – це основна внутрішньоклітинна тіолова редокс-система у клітинах [2]. За участю глутатіону відбувається детоксикація реакційно активних метаболітів Оксигену, які утворюються під час метаболізму різноманітних ендогенних і екзогенних речовин [3]. Як було зазначено, глутатіонпероксидазна активність сприяє відновленню пероксиду гідрогену, утвореного в реакції, яку каталізує СОД, а також гідропероксидів ліпідів із використанням GSH [1]. У NADPH-залежній реакції ГР каталізує процес відновлення глутатіону у клітинах. Оскільки для каталітичної активності ГП необхідна наявність відновленого глутатіону, то важливе значення має функціонування ГР, яка підтримує рівень GSH у клітинах [4].

На першому етапі виконання завдання було проведено дослідження активності ГП у коропа лускатого за умов дії 2, 5 та 50 ГДК Плюмбу. Як відомо, ГП каталізує реакцію перетворення пероксиду гідрогену до води з утворенням GSSH.

Як видно з таблиці, у гемолізаті за умов застосування 2 та 5 ГДК Плюмбу відзначалося зростання активності ГП на 21 та 30 % відповідно. Водночас використання 50 ГДК Плюмбу призводило до зниження активності досліджуваного ензиму в 1,8 раза ($p < 0,001$).

Отже, встановлено зростання активності ГП за умов концентрації 2 та 5 ГДК Плюмбу. Водночас експозиція риб з 50 ГДК Плюмбу супроводжувалася спадом активності досліджуваного ензиму у зразках порівняно з контрольною групою.

Таблиця

Активність глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази в еритроцитах крові коропа лускатого за дії різних концентрацій Плюмбу, GSH/мг білка за хв, GSSG/мг білка за хв ($M \pm m$; $n=7$)

Ензим	Контроль	Концентрація Плюмбу (Pb^{2+})		
		0,2 мг/л (2 ГДК)	0,5 мг/л (5 ГДК)	5 мг/л (50 ГДК)
ГП	22,58±2,58	28,54±1,95**	31,47±2,01***	14,25±1,67***
ГР	25,34±2,45	32,46±3,25*	38,25±4,02**	14,31±2,87***

Примітка. Різниця вірогідні порівняно з контролем: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Найбільш пов'язаним з ГП є ГР, другий ключовий ензим глутатіонового циклу. Він каталізує реакцію відновлення окисненого глутатіону за участю NADPH. Після 96-годинної експозиції з Плюмбом у концентрації, що еквівалентна 2 та 5 ГДК, у гемолізаті відзначалося зростання активності ГР на 22 ($p < 0,01$) та 35 % ($p < 0,001$) відповідно. Водночас 50 ГДК Плюмбу призводило до зниження активності досліджуваного ензиму удвічі ($p < 0,001$). Можна припускати, що виявлена активація найвірогідніше має компенсаторний характер і виникає у відповідь на токсичну дію Плюмбу, яка опосередковано може викликати гіперпродукцію пероксиду гідрогену в клітинах. Водночас 96-годинна експозиція риб з 50 ГДК Плюмбу супроводжувалася зниженням активності досліджуваних ензимів у всіх зразках коропа лускатого порівняно з контрольною групою. Отримані дані свідчать про значне напруження системи глутатіону на тлі інтенсифікації оксидативного стресу.

Висновки. Встановлено вірогідне зростання активності ензимів системи глутатіону в еритроцитах коропа лускатого за дії 2 та 5 ГДК йонів Плюмбу та пригнічення активності цих ензимів за дії 50 ГДК, на що може вказувати значне напруження захисних систем організму на тлі активації оксидативного стресу.

Бібліографічний список

1. Brigelius-Flohé R., Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*. 2013. Vol. 1830 (5). P. 3289–3303.
2. Dumaswala U. J., Zhuo L., Mahajan S. Glutathione protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. *Am. Journal Physiol. Cell Physiol*. 2001. Vol. 280 (4). P. 867–873.
3. Meister A., Anderson M. D. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*. 1983. Vol. 52. P. 711–760.
4. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*. 1999. Vol. 27 (9–10). P. 916–921.

Онисковець М., Лопотич Н., Скаб О.

АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ СИСТЕМИ ГЛУТАТІОНУ В ЕРИТРОЦИТАХ КОРОПА ЛУСКАТОГО ЗА ДІЇ ПЛЮМБУМУ

Актуальним є з'ясування метаболічних ефектів Плюмбуму в еритроцитах крові, які одними з перших підпадають під вплив зміненого під дією токсикантів внутрішнього середовища організму, а також володіють потужною системою антиоксидантного захисту. Тому метою було дослідити вплив Плюмбуму на активність ензимів системи глутатіону в еритроцитах коропа лускатого – одного з прісноводних видів риб, який широко розповсюджений у водоймах Західної України.

Досліди проводили на коропах (*Cyprinus carpio* L.) дворічного віку в резервуарах об'ємом 200 л. До кожної експериментальної групи було введено по 7 особин. Досліджували вплив на риб іонів Плюмбуму Pb^{2+} – за 0,2; 0,5 та 5 мг/л, що відповідають 2, 5 та 50 гранично допустимим концентраціям.

Встановлено вірогідне зростання активності ензимів системи глутатіону в еритроцитах коропа лускатого за дії 2 та 5 ГДК йонів Плюмбуму та пригнічення активності цих ензимів за дії 50 ГДК, на що може вказувати значне напруження захисних систем організму на тлі активації оксидативного стресу. Можна припускати, що виявлена активація найвірогідніше має компенсаторний характер і виникає у відповідь на токсичну дію Плюмбуму, яка опосередковано може викликати гіперпродукцію пероксиду гідрогену в клітинах. Водночас 96-годинна експозиція риб з 50 ГДК Плюмбуму супроводжувалася спадом активності досліджуваних ферментів у всіх зразках коропа лускатого порівняно з контрольною групою. Отримані дані свідчать про значне напруження системи глутатіону на тлі інтенсифікації оксидативного стресу.

Ключові слова: Плюмбум, еритроцити, кров, антиоксидантна система, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, коропа лускатий.

Onyskovets M., Lopotich N., Skab O.

THE ACTIVITY OF ENZYMES OF THE GLUTATHIONE SYSTEM IN ERYTHROCYTES OF SCALY CARP ON THE EFFECT OF PLUMBUM

It is known that the main mechanism of Plumbum toxicity is the development of oxidative stress as evidenced by disturbances in the pro-and antioxidant blood system as an integral indicator of the body status. In this regard, important is to ascertain the metabolic effects of Plumbum in red blood cells that are among the first to fall under the influence of toxins altered internal environment and possess strong antioxidant defense system. The purpose of our study was to investigate the effect of Plumbum on the activity of enzymes of the glutathione system in erythrocytes of scaly carp.

Experiments were performed on 2-year old fishes, which after the catching from natural pond were kept in aquaria under standard laboratory conditions. In our studies we used a two-year carp flake (*Cyprinus carpio* L.) with average weight 300–350 g. Each experimental group included in 7 animals. We investigated the influence of Plumbum ions (Pb^{2+}) at a concentration of 0,2; 0,5 and 5 mg/l, corresponding to 2; 5 and 50 maximum permissible concentration (MPC) on the fish organism. After a period of acclimation the fishes of studied groups were kept in the presence of $Pb(CH_3COO)_2 \times 3H_2O$. As a result of the studies we found a significant increase in the activity of antioxidant enzymes during exposure of 2 and 5 MPC Plumbum ions, and inhibition of enzyme activity at 50 MPC, indicating significant stress protective systems against the background of activation of oxidative stress. As a result of the studies we found a significant increase in the activity of antioxidant enzymes during exposure of 2 and 5 MPC Plumbum, and inhibition of enzyme activity at 50 MPC, indicating significant stress protective systems against the background of activation of oxidative stress.

Key words: Plumbum, erythrocytes, blood, antioxidant system, glutathione peroxidase, glutathione reductase, scaly carp.

Стаття надійшла 29.03.2018.