

Біохімія

УДК 594.3:594.1

ВПЛИВ ФЕНОЛУ НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ ПЕРЕАМІНУВАННЯ У ТКАНИНАХ *UNIO PICTORUM*

Л.Янович

*Житомирський державний педагогічний університет імені Івана Франка
вул. В.Бердичівська 40, Житомир, 10008 Україна
e-mail: Melnicenko@orta.net.ua*

Визначено головні токсикологічні показники (LC_{25} , LC_{50} , LC_{100}) дії фенолу на молюсків виду *Unio pictorum*. Досліджено вплив 250 (LC_{25}), 500 (LC_{50}) та 750 (LC_{75}) мг/дм³ фенолу водного середовища на рівень трансаміназної активності в тканинах мантиї, зябер, гепатопанкреаса, гонади *Unio pictorum*. Рівень трансаміназної активності у тканинах прісноводного двостулкового молюска *Unio pictorum* змінюється в разі дії щораз більшої (LC_{25} , LC_{50} , LC_{75}) концентрації фенолу. Співвідношення аспартатамінотрансфераза/аланін амінотрансфераза у випадку отруєння фенолом у самок переважно збільшується, у самців – зменшується.

Ключові слова: двостулковий молюск, гонада, гепатопанкреас, мантия, зябра, фенол, амінотрансферази

Молюски є одним з головних об'єктів біомоніторингу, що пов'язане з їхнім поширенням у донних біоценозах, здатністю акумулювати низку компонентів із води та стійкістю щодо забруднень. Одним із важливих показників обміну речовин у молюсків у разі зміни умов навколишнього середовища є рівень активності ферментів, які беруть участь в адаптивних перебудовах. До них належать ферменти переамінування – аланінамінотрансфераза (АЛТ, К.Ф.2.6.1.2) та аспартатамінотрансфераза (АСТ, К.Ф.2.6.1.1). У процесах обміну речовин живого організму трансамінази, зокрема АЛТ та АСТ, відіграють суттєву роль, зумовлену їхньою участю у переамінуванні амінокислот, а також у спряженні амінокислотного та вуглеводного обмінів. Трансамінази, особливо АСТ, беруть участь у синтезі сечовини. Є відомості про те, що АСТ пов'язана з транспортом у мембранах клітин, із енергетичною функцією мітохондрій та передаванням нервового імпульсу в синапсах [14]. Активність двох основних ензимів трансамінування (АЛТ та АСТ) у молюсків уперше описана на *Mytilus edulis* та *Modiolus modiolus* [8]. Відомі дослідження щодо змін вмісту цих ферментів під впливом нафти [13], токсинів синьозелених водоростей [9] і за анаеробних умов [3, 12]. Однак у літературі недостатньо відомостей про активність цих ферментів у тканинах прісноводних молюсків, зокрема двостулкових.

В експерименті використано 100 екз. *Unio pictorum*, зібраних вручну в р. Тетерів (Житомир) у теплий період (червень - липень) 2000 р. У вибірку ввійшли 4—6-річні особини. Транспортували молюсків у поліетиленових пакетах (без води). Доставлених у ла-

бораторію тварин піддавали впродовж двох діб аклімації до лабораторних умов. Орієнтовним дослідом, поставленим за методикою В.А. Алексєєва [1], з'ясовано значення основних токсикологічних показників для *U. pictorum*, які перебували у затруєному фенолом середовищі: $LC_0=100$, а $LC_{100}=1000$ мг/дм³. Значення LC_{25} та LC_{50} відшукували графічно.

У гострому досліді тварин витримували в розчинах фенолу (LC_{25} , LC_{50} , LC_{75}), приготованих на дехлорованій воді, дві доби. Через добу токсичне середовище змінювали.

Для аналізу використовували тканини зябер, мантиї, гепатопанкреаса та гонади. Шматочок тканини, попередньо зважений на електронних терезах четвертого класу (модель ВЛЕ – 1 кг), гомогенізували з розтертим у порошок склом. Додавали дистилат і центрифугували протягом 30 хв при 8000 об/хв. Активність ферментів визначали колориметрично. Досліджували ферменти цитоплазматичної фракції. Одержані результати переобчислювали на 1 г сирової маси тканини. Цифрові дані, отримані в експерименті, опрацьовано методами варіаційної статистики за Г.Ф. Лакіним [6].

Визначення трансаміназної активності у тканинах *U. pictorum* у нормі засвідчило, що активність АСТ та АЛТ в гепатопанкреасі, мантиї, зябрах, гонаді одного порядку (табл. 1, 2).

Таблиця 1

Активність АСТ у тканинах *U. pictorum* у нормі та в разі дії фенолу,
ммоль/год х 1 г сирової маси тканини

Концентрація фенолу у волі	Зябра		Мантия		Гепатопанкреас		Гонада	
	$x \pm t_x$	Відхилення від контролю, %	$x \pm t_x$	відхилення від контролю, %	$x \pm t_x$	відхилення від контролю, %	$x \pm t_x$	відхилення від контролю, %
Самки								
Контроль	24,22±0,80		22,60±0,71		32,54±0,86		16,50±1,20	
LC_{25}	22,90±0,80	-5,45	16,70±0,99	-26,10	43,68±1,10	+34,20	20,76±0,68	+25,80
LC_{50}	18,82±0,35	-22,30	22,90±0,84	+1,32	20,89±0,40	-35,80	45,52±1,20	+175,80
LC_{75}	11,40±0,64	-52,93	26,10±0,99	+15,40	4,56±0,93	-85,90	2,10±0,34	-87,20
Самці								
Контроль	35,39±0,90		25,50±0,60		35,90±1,0		16,46±0,99	
LC_{25}	29,40±0,37	-16,90	17,36±0,91	-31,90	41,30±0,68	+15,04	25,60±0,71	+55,50
LC_{50}	25,57±1,06	-27,70	23,28±0,85	-8,70	37,70±0,60	+5,01	26,40±0,86	+60,30
LC_{75}	16,03±0,50	-54,70	15,57±0,83	-38,90	15,39±1,10	-57,13	21,21±0,77	+28,80

Порівняння активності АСТ та АЛТ у тканинах самок і самців свідчить, що активність АСТ в усіх досліджених тканинах, окрім гонади, у самців дещо вища, ніж у самок (рис. 1, 2). Активність АСТ у гонади самців та самок приблизно однакова і становить $16,46 \pm 0,71$ та $16,5 \pm 1,2$ ммоль/год х 1 г сирової маси тканини, відповідно. Активність АЛТ у самців більша, ніж у самок у зябрах та гепатопанкреасі. У мантиї ж та гонаді в самок вона вища, ніж у самців, приблизно на 30 та 40%, відповідно.

Таблиця 2

Активність АЛТ у тканинах *U.pictorum* у нормі та в разі дії фенолу,
ммоль/год х 1 г сирової маси тканини

Концентрація фенолу у волі	Зябра			Мантия			Гепатопанкреас			Гонада		
	$\bar{x} \pm T_x$	відхилення від контролю, %	P	$\bar{x} \pm T_x$	відхилення від контролю, %	P	$\bar{x} \pm T_x$	відхилення від контролю, %	P	$\bar{x} \pm T_x$	відхилення від контролю, %	P
Самки												
Контроль	24,48±0,82			21,90±0,69			18,08±0,34			25,68±0,56		
LC ₂₅	13,79±0,69	-43,60		13,56±0,80	-38,08		29,30±0,01	+62,05		15,83±0,84	-38,35	
LC ₅₀	16,50±0,39	-32,50		21,70±0,85	-0,91		18,40±0,39	+1,76		28,20±0,61	+9,80	
LC ₇₅	10,67±0,83	-56,40		19,70±0,42	-10,04		4,86±0,99	+168,80		2,07±0,50	-91,90	
Самці												
Контроль	26,09±1,10			15,30±0,46			20,28±0,95			15,25±0,90		
LC ₂₅	27,80±0,91	+6,55		16,90±0,97	+10,45		26,19±1,1	+29,14		12,92±0,62	-15,27	
LC ₅₀	18,54±0,99	-28,90		15,90±0,89	+3,92		33,11±0,83	+63,26		20,25±1,10	+32,78	
LC ₇₅	11,00±0,77	-57,80		16,06±0,97	+4,96		16,84±0,64	-16,90		12,66±0,97	-16,98	

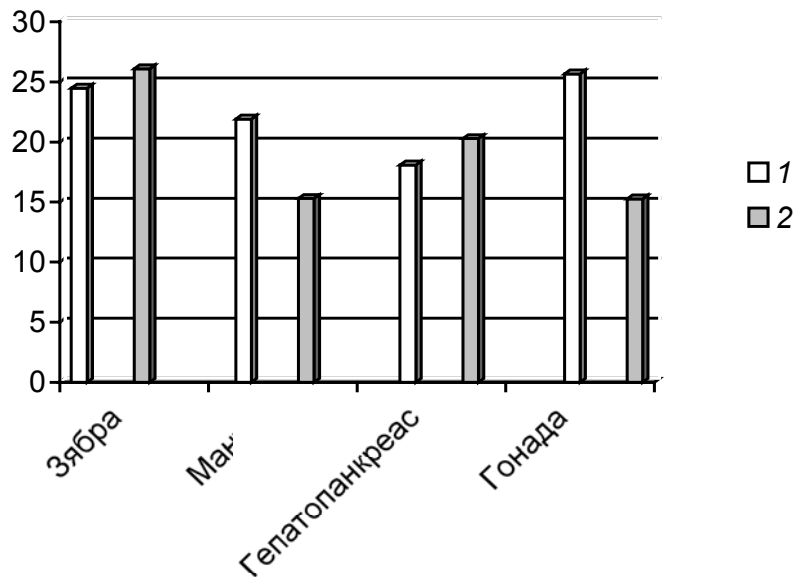


Рис. 1. Активність АЛТ у тканинах самок (1) та самців (2) *U.pictorum* у нормі, ммоль/год х 1 г сирової маси тканини.

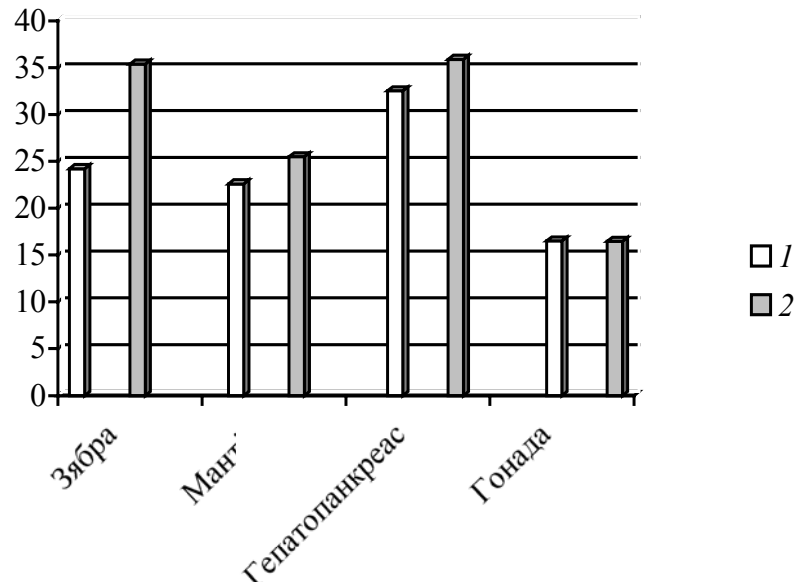


Рис.2. Активність АСТ у тканинах самок (1) та самців (2) *U. pictorum* у нормі, ммоль/год x 1 г сирієї маси тканини.

Різноманітні за природою антропогенні та інші впливи можуть зумовлювати різнонаправлені зміни активності амінотрансфераз у тканинах молюсків. Активування трансаміназ простежується не лише в разі нестачі кисню [4], а й у випадку інвазії [17], голодування [15], формування черепашки та зміни осмотичного тиску [16]. У разі дії токсикантів синьозелених водоростей активність обох трансаміназ у прісноводних молюсків збільшується на 25-90% [2]. Однак якщо спочатку діють йони важких металів, то простежується інгібування трансаміназ, що пов'язане з їхньою спорідненістю до сульфогідрильних груп [11]. З'ясовано [4], що йони Cu^{2+} , органічні отрути з миш'яком (ХФА) та оловом (ТБТО) інгібують АСТ і АЛТ у зябрах мідії, однак зі збільшенням експозиції цей ефект послаблюється. У наших дослідках активність АЛТ та АСТ у тканинах молюсків під впливом щораз більшої концентрації фенолу також змінювалась. Інтерес до фенольних сполук взагалі, та до їхньої біологічної дії зокрема, зумовлений повсюдним поширенням цих речовин автохтонного та алохтонного походження в підвищених концентраціях у водоймах різного типу, особливо влітку. Наприклад, у воді Шацьких озер зареєстровано перевищення концентрації фенолів від 1,2 до 12,8 раза [5], а у деяких водоймах України концентрація розчинених у воді фенолів може сягати 1850 мкг/л.

У разі дії на *U. pictorum* фенолу в концентрації LC_{25} активність АСТ у зябрах і мантії самців і самок зменшується, а в гепатопанкреасі та гонаді – збільшується (див. табл. 1, рис. 3, 4). Активність АЛТ за цієї ж концентрації фенолу у воді в тканинах зябер, мантії, гонад самок і самців також зменшується (табл. 2, рис. 5, 6), у решті ж тканин — збільшується, причому, у гепатопанкреасі самок збільшення становить близько 62%.

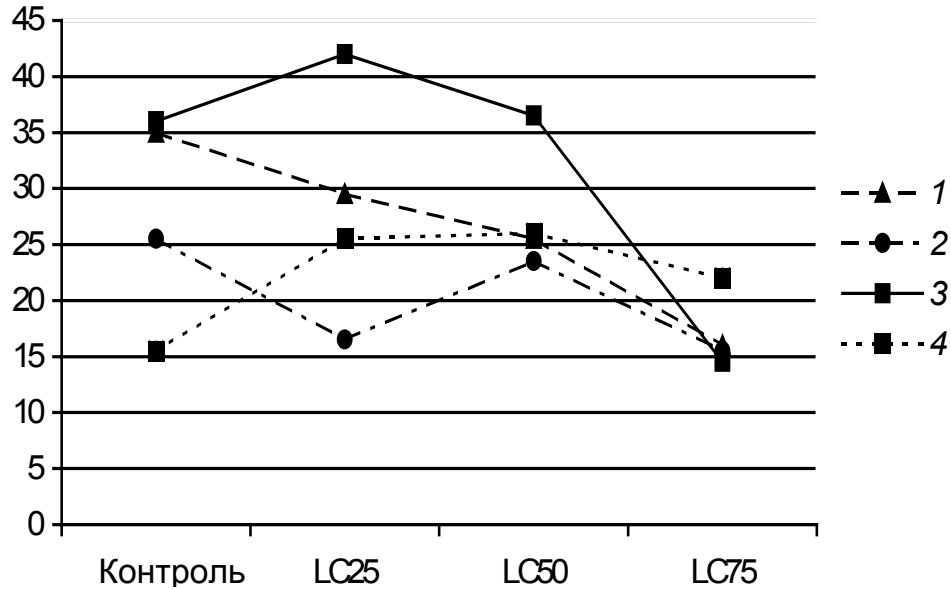


Рис. 3. Активність АСТ у зябрах (1), мантії (2), гепатопанкреасі (3), гонаді (4) у самців *U. pictorum* у нормі (контроль) та в разі отруєння фенолом (LC25, LC50, LC75), ммоль/год х 1 г сирої маси тканини.

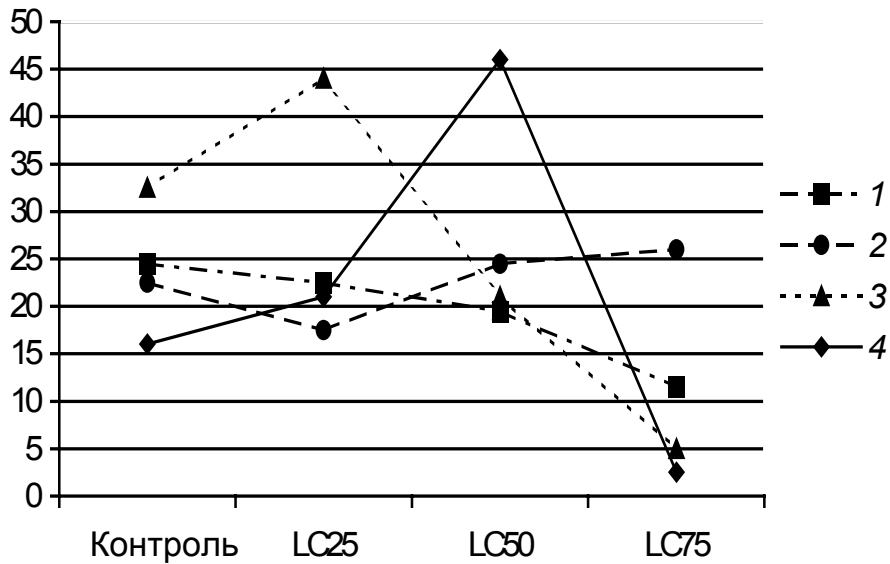


Рис. 4. Активність АСТ у зябрах (1), мантії (2), гепатопанкреасі (3), гонаді (4) у самок *U. pictorum* у нормі (контроль) та в разі отруєння фенолом (LC25, LC50, LC75), ммоль/год х 1 г сирої маси тканини.

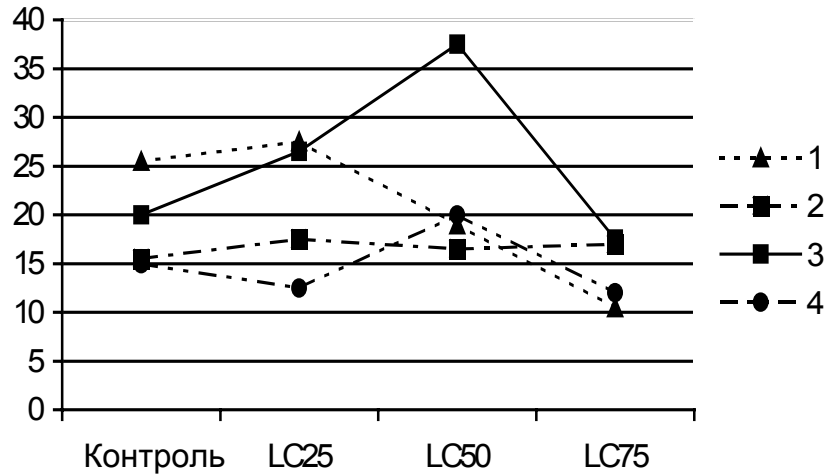


Рис. 5. Активність АЛТ у зябрах (1), мантиї (2), гепатопанкреасі (3), гонаді (4) у самців *U. pictorum* у нормі (контроль) та в разі отруєння фенолом (LC25, LC50, LC75), ммоль/год х 1 г сирової маси тканини.

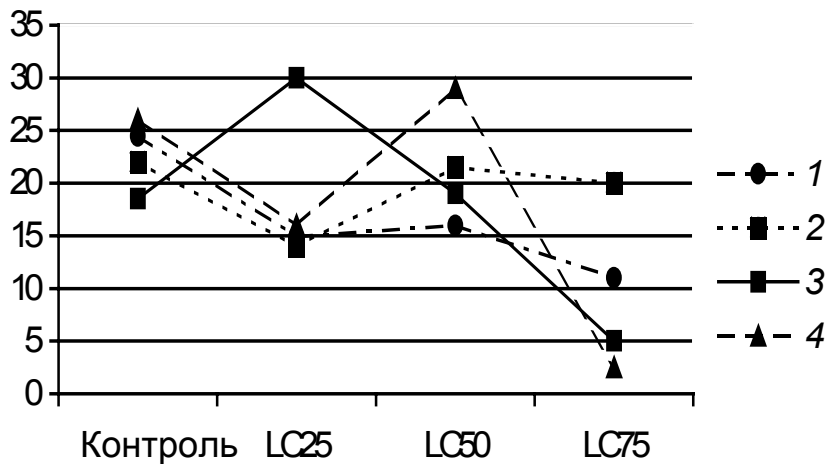


Рис. 6. Активність АЛТ у зябрах (1), мантиї (2), гепатопанкреасі (3), гонаді (4) у самок *U. pictorum* у нормі (контроль) та в разі отруєння фенолом (LC25, LC50, LC75), ммоль/год х 1 г сирової маси тканини.

У випадку дії на молюсків фенолу в концентрації, що відповідає LC₅₀, у самок активність АСТ у мантиї та гонаді збільшується як щодо контролю, так і щодо активності цього ферменту, це зафіксовано для згаданих тканин при концентрації фенолу LC₂₅. У зябрах та гепатопанкреасі самок активність АСТ за цієї ж концентрації продовжує зменшуватися. Активність АЛТ при LC₅₀ фенолу у самок *U. pictorum* в зябрах, мантиї та гонаді дещо збільшується, ніж при LC₂₅ фенолу. У самців таке підвищення простежується лише

у гепатопанкреасі та гонаді. Зареєстровані зміни, напевне, свідчать про спроби моллюсків іммобілізувати свої захисні сили. Припускають [7, 10], що зростання активності АЛТ за інтоксикації тварин може бути ознакою участі цього ферменту у процесах детоксикації в складі метаболічної системи глюкозо-аланінового циклу, оскільки відомо, що АЛТ – один із головних компонентів аланінової системи виведення аміаку, а на гідробіонтів вплив токсикантів у дозах, близьких до летальних, спричинює реакцію, подібну до гострого аміачного токсикозу [8].

Концентрація фенолу LC_{75} зумовлює здебільшого інгібування ферментів переамінування (АСТ та АЛТ) як у самців, так і в самок, що, напевне, свідчить про пригнічення у них процесів білкового обміну та підвищення деградації. Лише у мантиї самок активність АСТ зростає щодо активності, зафіксованої при LC_{50} фенолу, приблизно на 14%.

На підставі отриманих даних можна припустити, що реакція ферментних систем на дію фенолу має тканинну специфіку і залежить від концентрації токсиканта у водному середовищі. Також треба наголосити на досить високій активності АЛТ у тканинах моллюсків. У більшості інших груп безхребетних та хребетних тварин приблизно в 5-10 разів переважає активність АСТ над активністю АЛТ [16]. Висока активність АЛТ двостулкових моллюсків свідчить про їхню здатність до факультативного анаеробіозу, що надзвичайно важливо в умовах антропогенного забруднення.

Наочнішим є співвідношення активності АСТ/АЛТ (коефіцієнт де Рітца (КР)). На підставі змін цього коефіцієнта виділяють дві групи моллюсків: стійкіші до забруднення, у яких КР у разі антропогенного впливу зростає, і менш стійкі, у яких цей показник за умов забруднення знижується.

Отримані у нашому досліді значення АСТ/АЛТ свідчать про те, що цей показник змінюється в разі інтоксикації моллюсків фенолом (табл. 3.). У самок показник АСТ/АЛТ переважно збільшується, а в самців, навпаки, зменшується.

Таблиця 3

Відношення показників активності АСТ/АЛТ у тканинах *U. pictorum* у нормі та при отруєнні фенолом

Тканина	Самки						
	Контроль	LC_{25}	Відхилення від контролю, %	LC_{50}	Відхилення від контролю, %	LC_{75}	Відхилення від контролю, %
Самки							
Зябра	0,98	1,66	+69,30	1,14	+16,32	1,06	+8,16
Мантия	1,03	1,23	+19,40	1,05	+1,94	1,32	+28,15
Гепатопанкреас	1,79	2,10	+17,30	1,13	-36,80	0,94	-47,40
Гонада	0,64	1,31	+104,70	1,61	+151,56	2,21	+24,53
Самці							
Зябра	1,35	1,05	-22,22	1,38	+2,22	1,45	+7,40
Мантия	1,66	1,02	-38,55	+1,46	-12,04	0,96	-42,16
Гепатопанкреас	1,77	1,57	-11,25	1,13	-36,15	0,72	-59,32
Гонада	1,08	1,98	+83,30	1,30	+20,37	1,67	+54,60

Отже, виконані біохімічні дослідження у поєднанні з токсикологічними засвідчили, що зміна активності АСТ і АЛТ, а також зміна співвідношення активності ферментів АСТ/АЛТ можуть слугувати характеристиками ступеня витривалості молюсків до забруднення середовища і для порівняльного аналізу рівня забрудненості різних водойм.

1. *Алексеев В.А.* Основные принципы сравнительно-токсикологического эксперимента // Гидробиол. журн. 1981. Т. 17. №3. С. 92-100.
2. *Биргер Т.И.* Метаболизм водных беспозвоночных в токсической среде. К.: Наукова думка, 1979. 189 с.
3. *Горомосова С.А., Таможня В.А.* Уровень трансаминазной активности в тканях мидий в норме и в условиях гипоксии // Биология моря. 1979. Вып. 48. С. 118-122.
4. *Горомосова С.А., Шапиро А.З.* Основные черты биохимии энергетического обмена мидий. М.: Легкая и пищевая пром-ть, 1984. 120 с.
5. *Коновалов Ю.Д.* Фенольные соединения в воде Шацких озер // Роль охоронюваних природних територій у збереженні біорізноманіття: Матеріали конф., присвяченої 75-річчю Канівського природного заповідника, м.Канів, 8-10 вересня 1998 р. Канів, 1998. С. 277-278.
6. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1973. 343 с.
7. *Ленинджер А.* Основы биохимии. М.: Мир, 1985. Т. 2. 368 с.
8. *Лукьяненко В.И.* Общая ихтиотоксикология. М.: Легкая и пищевая пром-ть, 1983. 320 с.
9. *Маляревская А.Я.* Обмен веществ у рыб в условиях антропогенного эвтрофирования водоемов. К.: Наук. думка, 1979. 253 с.
10. *Смирнов А.В.* Роль глюконеогенеза при физической деятельности // Успехи совр. биологии. 1984. Т. 94. №3. С. 399-412.
11. *Филенко О.Ф., Хоботьев В.Г.* Загрязнение металлами // Новости науки и техники, ВИНТИ. 1976. Т. 3. С. 48-80.
12. *Шапиро А.З., Бобкова А.Н.* Активность гликолитических ферментов в тканях беспозвоночных: Биохимическая эволюция. Л.: Наука, 1973. С.42-47.
13. *Chambers J.E., Heitz J.R., McCorkle F.M., Jarbrough J.D.* The effect of crude oil on enzymes in the brown shrimps (*Penaeus sp.*) // Comp. Biochem. Physiol. 1978. Vol 61 с. N1. P. 29-32.
14. *Garcia-Segura L.M., Martines-Rodriguez R., Toledano A.* Etude histochemique de l'activite aspartate aminotransferase dans la moëlle, le bulbe et les noyaux cerebelleux centraux de quelques vertebres // Z. mikrosk.-anat. Forsch. 1976. Vol. 90. N 2. S. 248-260.
15. *Goddard C.K., Martin A.W.* Physiology of mollusca. Carbohydrate metabolism / Ed. by K.M. Wilbur, C.M. Jonge // Ac.Press., New York. 1966. Vol. 1. P. 275-308.
16. *Hammen C.S.* Aminotransferase activities and amino acid excretion of bivalve mollusks and brachiopods // Comp. Biochem. Physiol. 1968. Vol. 26 B. N4. P. 697-705.
17. *Manohar L., Venkateswara P. Rao. Swamy K.S.* Variations in Aminotransferase Activity and Total Free Amino Acid Levels in the Body Fluid of the Snail *Lymnaea luteola* during Different Larval Trematode Infections // J. Invertebr. Patology. 1972. Vol.19. N1. P. 36-41.

18. *Read K.P.H.* Transamination in certain tissue homogenates of the bivalves mollusks *Mytilus edulis* L. and *Modiolus modiolus* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1962. Vol.7. N1. P. 15-22.

**THE EFFECT OF PHEHOL ON THE TRANSAMINATION ACTIVITY IN THE
TISSUES U. PICTORUM**

Yanovisch L.N.

*Zhytomir State Pedagogical University
Bolshaja Berdichevskaja 40, Zhytomir, 10008 Ukraine
e-mail: Melnicenko@orta.net.ua*

Is established basic toxic parameters (LC_0 , LC_{50} , LC_{100}) for phenol at influence on molluscs of a kind *Unio pictorum*. The effect of the 250 (LC_{25}), 500 (LC_{50}) and 750 (LC_{75}) mg/dm^3 phenol of the water environment on the level of transamination activity in the tissues of mantle, gills, hepatopancreas, gonad of *Unio pictorum* was investigated.

The level of transamination activity in the tissues of freshwater bivalvia mollusks *Unio pictorum* changes by the action of phenol growing (LC_{25} , LC_{30} , LC_{75}) concentration. The ratio of AST/ALT by phenol poisoning of females increases in many cases, of males it lowers.

Key words: bivalvia mollusks, gonad, hepatopancreas, mantle, branchia, phenol, aminotransamination.

Стаття надійшла до редколегії 15.03.2003
Прийнята до друку 15.04.2003