

УДК 574.5:504.054

Мудра А.Є.

СТАН ГЛУТАТІОНУ В ГЕПАТОЦИТАХ КОРОПА І РАКА ЗА ДІЇ ПОШКОДЖУЮЧИХ ЧИННИКІВ СЕРЕДОВИЩА

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет
імені І.Я. Горбачевського МОЗ України»
Тернопіль, Україна, mudra06@mail.ru

Ключові слова: короп, рак, глутатіон, важкі метали, фенол

Проблема забруднення навколишнього природного середовища в Україні належить до найактуальніших. Головними джерелами біологічного забруднення вод суші і прибережних вод морів є побутові стоки, які містять фекалії, стічні води підприємств харчової промисловості, целюлозно-паперової та хімічної промисловості, а в сільській місцевості - стоки великих тваринницьких комплексів. Хімічне забруднення створюється надходженням у воду різних отруйних речовин. Основні джерела хімічного забруднення - це доменне і сталеплавильне виробництво, підприємства кольорової металургії, гірничодобувна, хімічна промисловість і великою мірою екстенсивне сільське господарство. Крім прямих викидів стічних вод у водойми і поверхневого стоку, треба враховувати також потрапляння забруднювачів на поверхню води безпосередньо з повітря [9].

Справа в тому, що шкідливі домішки, які містяться у воді в незначних концентраціях, накопичуються в деяких організмах, що вживаються людьми у їжу. Спочатку отруйні речовини потрапляють у тканини найдрібніших планктонних організмів, потім вони накопичуються в організмах, які в процесі дихання і харчування фільтрують велику кількість води (молюски, губки і т. п.) і в кінцевому підсумку як по харчового ланцюга, так і в процесі дихання концентруються в тканинах риб [7, 8]. У результаті концентрація отрут в тканинах риб може стати більше, ніж у воді, в сотні і навіть тисячі разів. Для контролю за техногенним забрудненням ґрунтів прийнято визначати валовий вміст важких металів в ґрунтах та водоймах, проте останній не повністю характеризує ступінь небезпеки забруднення [1, 5, 27]. Тому дедалі більше уваги в моніторингу стану водойм приділяється пошуку адекватних біомаркерів ефекту і експозиції гідробіонтів. До найперспективніших маркерів відносять біохімічні показники, які дозволяють виявити ранні ознаки дії несприятливого чинника [4, 9].

Тому метою нашого дослідження було порівняти стан глутатіонової системи у тканинах печінки у представників прісноводних тварин коропа та рака, які мають важливе промислове значення, належать до одного біотипу, але філогенетично віддалені між собою.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводились на дворічках коропа лускатого (*Cyprinus carpio L.*) масою 200 - 250 г) та дорослих особинах рака вузькопалого (*Astacus leptodactylus Eschscholtz*) живою масою 50 ± 5 г. Тварин виловлювали влітку траловим методом із ставків Тернопільського обласного рибкомбінату (урочище Залісці) та адаптували до лабораторних умов протягом 7 діб у басейнах об'ємом 200 л з кількістю тварин 6-10 особин на басейн при температурі близько 18°C у відстояній, добре аерованій воді. У кожному лабораторному досліді одна група була контрольною, іншій у воду додавали солі важких металів або фенол. Для дослідження ми використовували іони металів, які є поширеними забруднювачами прісних водойм України [5]. Найнижчі із створених нами модельних концентрацій чинників відповідають нижній межі токсичності для гідробіонтів та діапазону їх екологічно реальних концентрацій у прісних водоймах України (0,1 ГДК) [5]. Для іонів металів досліджувались також у 20 і 50 разів вищі концентрації у воді (відповідно 2 і 5 ГДК). За умов індивідуальної дії вміст у воді Cu^{2+} (CuSO_4) в розрахунку на катіон складав 0,01, 0,2 або 0,5 мг/л; Zn^{2+} (ZnSO_4) – 0,1, 2,0 або 5,0 мг/л ; Mn^{2+} (MnCl_2) – 0,13, 2,6 або 6,0 мг/л; Pb^{2+} ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) – 0,01, 0,2 або 0,5 мг/л, фенолу – 0,002 мг/л. При дослідженні дії суміші іонів вміст компонентів складав Cu^{2+} – 0,01 мг/л, Zn^{2+} – 0,1 мг/л, Mn^{2+} – 0,13 мг/л, Pb^{2+} – 0,01 мг/л. Протягом експерименту вміст металу контролювали за допомогою атомно-абсорбційної спектроскопії. Період інкубації становив 14 діб. Тварин годували гранульованим кормом для риб. Всі процедури з виділення та обробки зразків проводили за температури 4°C . Для аналізу використовували у коропа передню долю печінки, а у рака – гепатопанкреас. Всі процедури з виділення і обробки зразків проводились на холоді. Для визначення біохімічних показників готували 5 %-ний або 10 %-ний гомогенат тканини у 10 мМ трис-НСІ буферному розчині, рН 7,4 за допомогою електричного гомогенізатора Поттера з тефлоновим пестиком та пробірки із кварцового скла з охолоджуючим кожухом.

Всі процедури з виділення і обробки зразків проводились на холоді. Всі реактиви, крім нижче зазначених, були фірми “Реахим” кваліфікації “хч”. Експерименти на рибах проводились у відповідності до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1986), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000).

Вміст глутатіону (відновленого, GSH і загального глутатіону) в тканині визначали неферментативно за реакцією з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою (“Sigma”, США) у кислоторозчинному екстракті 10 %-го гомогенату тканини [25] в присутності 0,02 М ЕДТА, що забезпечує реакційну здатність SH-груп внаслідок їх вивільнення від

більшої частини зв'язаного металу. Для осадження білків використовували трихлороцтову кислоту, кінцевий вміст якої в системі становив 5 %.

Для визначення загального вмісту глутатіону (GSH + GSSG, в еквівалентах GSH) дисульфідні зв'язки відновлювали за допомогою NaBH_4 у 8 М сечовині. Після відновлення залишок боргідриду руйнували додаванням 0,3 мл 1 н HCl . Через 3 хв. доводили рН до 8,0 додаванням 3 мл 0,4 М трис- HCl буферу, рН 8,9 і додавали 0,1 мл 10 мМ ДТНБ. Поглинання вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при 412 нм проти контролю на реагенти. Вміст SH-груп обчислювали за коефіцієнтом молярної екстинції продукту реакції тіонітрофеноляту при 412 нм - 11400 л/моль·см (в трис- HCl буферному розчині), або 14290 л/моль·см (у 8 М сечовині) [2].

Вміст GSH та загального глутатіону (GSH + GSSG, в еквівалентах GSH) обчислювали за відповідними мілімолярними коефіцієнтами екстинції, а вміст GSSG – як різницю вмісту загального глутатіону і GSH. Обчислювали редокс-індекс глутатіону: $\text{PI GSH} = \frac{[\text{GSH}] + 2[\text{GSSG}]}{2[\text{GSSG}]}$ [11].

Результати подавали у вигляді $M \pm m$, $n=5$. Вірогідність відхилення двох рядів значень обчислювали з використанням t-тесту Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Низькомолекулярний тіол трипептид глутатіон є поліфункціональним клітинним компонентом, вміст якого чутливо реагує на різноманітні чинники. Його функціонування пов'язане з окисно-відновними перетвореннями $2\text{GSH} \leftrightarrow \text{GSSG}$, координуванням іонів металів (в першу чергу Zn^{2+} та Cu^+) та кон'югацією з різними речовинами. Тому визначення вмісту GSH та GSSG вважається інформативним показником стану клітин [6, 16, 29, 31]

Визначення вмісту глутатіону в печінці коропа (табл. 1) показало, що близько 90 % його знаходиться у відновленій формі, що відповідає відомостям про цей внутрішньоклітинний тіол [6].

Таблиця 1

Вміст відновленого і окисненого глутатіону (мкмоль/г тканини) у печінці коропа за дії важких металів і фенолу у підпорогових концентраціях на організм, $M \pm m$, $n=5$

Дослідна група	Відновлений глутатіон	Окиснений глутатіон
Контроль	2,63±0,13	0,33±0,02
Мідь	4,06±0,22*	0,75±0,12*
Цинк	3,85±0,18*	0,99±0,16*
Марганець	3,65±0,11*	0,89±0,14*
Свинець	3,01±0,33*	1,37±0,14*
Суміш іонів	3,79±0,32*	0,79±0,05*
Фенол	4,30±0,41*	2,29±0,28*

Примітка: *- зміни порівняно з контролем вірогідні ($p < 0,05$).

Іншими авторами одержано подібні результати. Так, в печінці форелі вміст загального глутатіону становить $1,54 \pm 0,39$ мкмоль/г тканини, а на GSSG припадає близько 6 % від його кількості ($0,09 \pm 0,02$ мкмоль/г тканини) [26].

Дія ЕРК всіх досліджуваних чинників на коропа викликає підвищення вмісту як GSH, так і GSSG у печінці (табл. 1). Проте зростання вмісту GSSG в тканині виявилось більш значним – його вміст у експериментальних тварин перевищував значення контролю більше як у два рази. Обчислення редокс-індексу глутатіону показало, що, не зважаючи на активацію обміну глутатіону в цілому, відбувається зміщення рівноваги в бік окисненого стану цього тіолу (рис. 1). Ступінь цих змін відрізняється для дії різних чинників, проте у кожному випадку є досить істотним. Особливо помітно редокс індекс глутатіону зменшується порівняно з контролем за дії на організм свинцю. Отже, незалежно від природи діючого чинника, спостерігаються однотипні зміни показників обміну глутатіону – активація його обміну з посиленням прооксидантних змін.

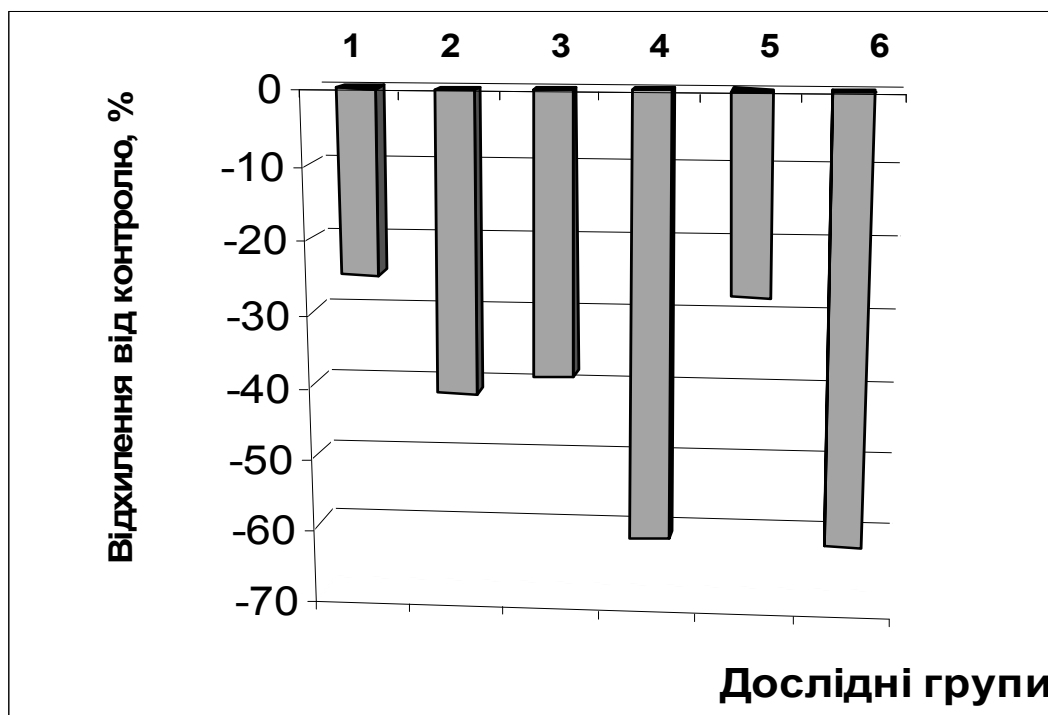


Рис. 1. Редокс-індекс глутатіону у печінці коропа за впливу на організм:
 1 – міді, 2 – цинку, 3 – марганцю, 4 – свинцю, 5 – суміші металів,
 6 – фенолу в підпорогових концентраціях.

За дії 2 ГДК чинників лише мідь викликає вірогідне зменшення вмісту GSH, а інші чинники не впливають на його вміст (табл. 2). Дія 5 ГДК металів, навпаки, приводить до збільшення вмісту GSH у тканині за дії цинку і свинцю і не впливає на його вміст за дії інших металів. Отже, лише дія 0,1 ГДК викликає неспецифічну адаптивну відповідь системи

глутатіону в печінці коропа, тоді як вищі концентрації металів приводять до менш помітних та метал-специфічних змін.

Таблиця 2

Вміст відновленого глутатіону (мкмоль/г тканини) у печінці коропа за дії важких металів у сублетальних концентраціях на організм,

M±m, n=5

Дослідна група	Вміст відновленого глутатіону
2 ГДК	
Контроль	2,06±0,25
Мідь	1,44±0,12*
Цинк	2,27±0,21
Марганець	1,73±0,21
Свинець	1,96±0,14
5 ГДК	
Контроль	1,65±0,04
Мідь	1,67±0,05
Цинк	5,04±0,05*
Марганець	1,48±0,19
Свинець	6,65±0,74*

Примітка: *- зміни порівняно з контролем вірогідні ($p < 0,05$).

Вміст GSH в тканині рака вищий удвічі, ніж в тканині коропа (табл.3). За дії важких металів він зростає проти контролю, як і у коропа. Лише дія фенолу приводить до протилежної порівняно із коропам відповіді - зменшення вмісту GSH.

Аналіз літературних даних, як і наші результати, свідчить про те, що вміст GSH у гепатоцитах є надзвичайно чутливим показником дії хімічного забруднення середовища, як важкими металами, так і органічними речовинами. Кінцевий результат відповіді з боку глутатіонової системи гепатоцитів, очевидно, можна оцінювати за наступним принципом. За адаптивної відповіді це збільшення вмісту GSH, в результаті чого створюються умови для його участі у детоксикації, наприклад утворенні кон'югатів, що передують виведенню токсину [22, 30]. Збільшення вмісту GSH у метаболічно активних тканинах відзначають, як правило, за довготривалої дії токсикантів. Так, вміст GSH збільшується в печінці риба за дії іонів кадмію, ртуті, свинцю, а також деяких органічних речовин протягом 5 – 24 діб [29]. Дія на рибу *Rutilus rutilus* сублетальних концентрацій фунгіциду процимідону також викликала збільшення концентрації глутатіону в печінці після 14 днів інкубації, причому активність КАТ залишалась стабільною [21].

Таблиця 3

Вміст відновленого глутатіону (мкмоль/г тканини) у гепатопанкреасі рака за дії важких металів і фенолу у підпорогових концентраціях на організм, $M \pm m$, $n=5$

Дослідна група	Вміст відновленого глутатіону
Контроль	4,86±0,28
Мідь (II)	6,41±0,16*
Цинк (II)	5,62±0,33*
Марганець	6,03±0,27*
Свинець	6,30±0,45*
Суміш іонів	6,29±0,32*
Контроль	5,71±0,32
Фенол	3,62±0,14*

Примітка: *- зміни порівняно з контролем вірогідні ($p < 0,05$).

Зменшення вмісту GSH указує на невідтвірні втрати його тканиною, наприклад, за рахунок окиснення, виведення в русло крові або пригнічення синтезу чи конкуренції за субстрати [6]. Ми відзначили зростання вмісту GSH у 75 % дослідних груп, а зменшення лише у 20 %. Отже, за ознакою зменшення вмісту GSH за дії 2 ГДК міді і свинцю, 5 ГДК марганцю на коропа та фенолу на рака в їх гепатоцитах створювались умови недостатнього забезпечення цим транспортним тіолом та антиоксидантом.

Найбільш потужним окиснювачем глутатіону серед іонів важких металів вважається мідь. Вона окиснює GSH вже в фізіологічній концентрації [12, 15]. Але навіть її дія викликає зменшення вмісту GSH в печінці у коропа лише за перевищення 0,1 ГДК. У всіх інших випадках вміст GSH в печінці коропа зростає, що, не зважаючи на посилене окиснення, можна вважати адаптивною реакцією, спрямованою на детоксикацію забруднювачів і оптимізацію клітинного метаболізму. Вивчення впливу гострої дії нікелю, кадмію і міді на стан відновного циклу глутатіону в печінці миші показало, що лише мідь викликає різке зменшення співвідношення вмісту GSH/GSSG [11]. Згідно наших даних така специфічна дія міді проявлялась при 2 ГДК у воді.

Оцінюючи зміни в системі глутатіону за дії свинцю, для якої відзначено і зменшення вмісту GSH (2 ГДК), так і більш як чотириразове зростання вмісту GSH (5 ГДК) в печінці коропа проти контролю, слід відзначити, що в літературі також відомі різні типи відповіді глутатіону тварин на збільшення вмісту свинцю в середовищі. Так, відомо, що при дії свинцю протягом одного тижня на рибу *Atlantic croaker* спостерігається збільшення в 1,44 рази рівня глутатіону в печінці, але хронічна дія свинцю не викликає змін тіолів в цій тканині. Не зважаючи на чутливість вмісту GSH до дії свинцю, у горбиля *Micropogonias undulatus* не відзначено

залежності між вмістом GSH в тканинах та акумуляцією в них свинцю за його вмісту вище порогового - 1 мкг/г тканини. [28].

Збільшення вмісту GSH в печінці після дії цинку в концентраціях 0,15 і 1,0 мг/л протягом 14 діб відзначали, також, і у форелі [16] Для крові коропа, також, характерна така відповідь за дії сублетальних концентрацій цинку на організм [3].

В літературі немає однозначних даних про безпосередню участь GSH в детоксикації свинцю, так як його іони не належать до пріоритетних у зв'язуванні з цим тіолом, зокрема на гепатоцитах форелі було показано, що вилучення GSH не збільшує токсичність свинцю [17].

Зменшення вмісту GSH за дії фенолу в гепатопанкреасі рака можна розцінити як результат його некомпенсованого окиснення або ж участі в кон'югації фенолу в процесі його знешкодження. Різноманітні токсини, які перетворюються у більш полярні похідні, приводять до вилучення клітинного глутатіону [30], проте конкретна інформація щодо кон'югації фенолу з глутатіоном нам невідома.

Для характеристики системи глутатіону здебільшого визначають активність ферментів його обміну – глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази [6]. Вплив екстремальних чинників на редокс-індекс глутатіону у гідробіонтів досліджений значно менше. Дослідження дії 0,15 і 1,0 мг/л цинку на форель показало, що після 14 діб інкубації відбувається істотне збільшення вмісту GSH в печінці, проте співвідношення концентрацій GSH/GSSG не змінюється [17]. Stephensen et al. [26] показали, що різноманітні індуктори оксидативного стресу у низькій та високій нелетальних дозах приводять до збільшення вмісту GSH і, в деяких випадках, але менш значного – вмісту GSSG. З іншого боку, голод, дефіцит білку і сірковмісних амінокислот приводять до зменшення вмісту GSH в печінці в 2 – 3 рази, що може бути пов'язане з його використанням для неокисних змін, зокрема реакцій кон'югації, але вміст GSSG при цьому не змінюється [6].

Часто зміни вмісту GSH пов'язують з його участю в знешкодження продуктів пероксидації. Вважають, що використання GSH в реакціях пероксидного окиснення, індукованого металами перемінної валентності, або зв'язування його безпосередньо з іонами металу також може привести до збільшення його рівня в печінці шляхом індукції синтезу [20], хоча з іншого боку, відзначався і протилежний ефект: збільшення вмісту активних форм кисню та пероксидів у мозку при дії марганцю була пов'язана із зменшенням вмісту GSH та глутатіонпероксидази [18]. З іншого боку, GSH, який звичайно вважають антиоксидантом, може діяти як прооксидант у фізіологічних умовах і, внаслідок цього, брати участь в радикальному ураженні клітин [13], що, в кінцевому рахунку, може проявлятися у збільшенні концентрації GSSG. Порівняння дії кадмію, ртуті, свинцю, міді і нікелю на редокс-цикл глутатіону показало, що ртуть

найбільш, а свинець найменш токсичний за умов 24 год інкубації клітин [14].

Як виявилось у останні роки, глутатіон задіяний у тонкій системі регуляції експресії генів при формуванні антистресорної відповіді [20]. Так, з'ясування безпосередніх причин активації родини генів білків теплового шоку при дії йодацетаміду показало, що ця активація зумовлена, в свою чергу, активацією фактора транскрипції-1 теплового шоку. Додавання антиоксидантів і хелаторів заліза або кальцію запобігає загибелі клітин, але не запобігає активації фактора транскрипції. Показано, що безпосередньою причиною цієї активації є втрата клітиною небілкових і білкових тіолів до рівня відповідно 20 і 70 % від вмісту в контрольних клітинах. При цьому окисно-відновні перетворення глутатіону та його змішаних з білками дитіолів відбуваються за участю іонів металів, зокрема цинку і зі всіх адаптивних процесів при стресі цей шлях, відкритий нещодавно, є самим швидким. Два інші механізми, які використовуються в стратегії антиоксидантного захисту, – підтримання відновного стану молекул за рахунок двох незалежних відновних факторів GSH і тіоредоксину (починається негайно і триває до відновлення потенціалу на вихідному рівні) та синтез *de novo* антиоксидантних ферментів (повільна відповідь), також залежать від відновного стану клітини [24].

Тому зміни, які ми спостерігали у стані глутатіону у коропа і рака, можуть робити істотний внесок у адаптації тварин до досліджуваних чинників.

Порівняння змін стану АПС і глутатіону у коропа і рака дозволяє виділити спільні закономірності, які простежуються за дії багатьох чинників – це поєднання зменшеної активності СОД із збільшеним вмістом GSH (дія 0,1 ГДК більшості чинників на коропа і рака) або (дія 2 ГДК чинників на коропа та 0,1 ГДК чинників на рака) із активацією КАТ. Таку модель відповіді системи антиоксидантного захисту спостерігають при адаптації тварин до несприятливих умов, зокрема до тривалого охолодження у щурів [23]. Її пояснюють як частину адаптивної відповіді до новоствореної окисно-відновної рівноваги в умовах дії несприятливих чинників, зокрема активації процесів пероксидації за участю КАТ та GSH.

ВИСНОВОК

Таким чином, аналіз стану глутатіону у водних тварин свідчить, що дія ЕРК іонів важких металів викликає однотипну відповідь у коропа і рака, тоді як механізм змін глутатіону за дії фенолу у коропа і рака протилежний. Вищі, ніж ЕРК концентрації іонів металів викликають специфічні до природи металу зміни вмісту GSH. В цілому система глутатіону у коропа і рака виявилась високочутливою і селективною до дії іонів важких металів і фенолу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Брагинский Л.П., Линник П.Н. К методике токсикологического эксперимента с тяжелыми металлами на гидробионтах // Гидробиол. журн. 2003. т.39, №1. с.92-104.
2. Веревкина И. В., Точилкин А. И., Попова И. А. Колориметрический метод определения SH-групп и –S-S-связей в белках при помощи 5,5/-дителиобис (2-нитробензойной) кислоты // Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. - С. 223 - 231.
3. Зіньковська Н. Г. Вивчення антиоксидантно-прооксидантного статусу крові коропа при дії йонів цинку в сублетальних дозах // Наукові записки Тернопільського педуніверситету. Серія: Біологія. 2001. №2(13). С. 50-53.
4. Котеров А. Н., Никольский А. В. Молекулярные и клеточные механизмы адаптивного ответа у эукариот // Укр. биохим. журн. 1999. –Т. 71, № 3. – С. 13 – 25.
5. Линник П.Н., Васильчук Т.А., Линник Р.П., Игнатенко И.И. Сосуществующие формы тяжелых металлов в поверхностных водах Украины и роль органических веществ в их миграции // Методы и объекты химического анализа. - 2007. - 2, № 2. - С. 130-145.
6. Мещишен І. Ф. Глутатіонова система організму за умов норми і патології. – Чернівці: Медакадемія, 1999. – 26 с.
7. Силаева А. А., Протасов А. А. Состав и структура зообентоса р. Стырь в зоне Ровенской АЭС и оценка ее влияния на донные группировки // Гидробиол. журн. – 2005. – Т. 41, № 4. С.25-45.
8. Худий О. І. Зміни в іхтіофауні різних ділянок Дністра під впливом антропогенних чинників // Гидробиол. журн. – 2002. – Т. 38, №6. – С. 33–39.
9. Цудзевич Б.О., Столяр О.Б., Калінін І.В., Юкало В.Г. Ксенобіотики: накопичення, детоксикація та виведення з живих організмів: монографія. Тернопіль: Вид-во ТНТУ ім. І. Пулюя, 2012. 384 с.
10. Allen T., Rama S. V. S. Oxidative stress by inorganic arsenic: modulation by thyroid hormones in rat // Compar. Biochem. Physiol. - 2003. – Vol. 135C, N 2. – P. 157 - 162.
11. Cartana J., Romeu A., Arola L. Effects of copper, cadmium and nickel on liver and kidney glutathione redox cycle of rats (*Rattus sp.*) // Compar. Biochem. Physiol. – 1992. – Vol. 101C, № 2. - P. 209-213.
12. Conners D. E., Ringwood A. H. Effects of glutathione depletion on copper cytotoxicity in oysters (*Crassostrea virginica*) // Aquatic Toxicol. – 2000. – Vol. 50, № 4. P. 341-349.
13. Freedman J. H., Ciriolo M. R., Peisach J. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity // J. Biol. Chem. – 1989. – Vol. 264, N 10. – P. 5598-5605.
14. Garcia-Fernández A. J., Bayoumi A. E., Pérez-Pertejo Y. et al. Alterations of the glutathione-redox balance induced by metals in CHO-K1 cells // Compar. Biochem. Physiol. – 2002. – 132 C, N 3. – P. 365 – 373.
15. Handy R. D. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? // Compar. Biochem. Physiol. – 2003. – 135A, N 1. – P. 25 – 38.
16. Jiang L.-J., Maret W., Vallee B. L. The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1998. – Vol. 95, N 7. – P. 3483-3488.
17. Lange A., Ausseil O., Segner H. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to

- cadmium and zinc // *Compar. Biochem. Physiol.* 2002. Vol. 131C, № 3. P. 231 – 243.
18. Liccione J. J., Maines M. D. Selective vulnerability of glutathione metabolism and cellular defense mechanisms in rat striatum to manganese // *J. Pharmacol. Experiment. Therapeutics.* – 1988. – Vol. 247, № 1. – P. 156 – 161.
 19. Mates M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology // *Toxicology.* – 2000. – Vol. 153, № 1 – 3. – P. 83 – 104.
 20. Moran L. K., Gutteridge J. M., Quinlan G. J. Thiols in cellular redox signalling and control // *Curr. Med. Chem.* – 2001. – Vol. 8, № 7. – P. 763 – 772.
 21. Paris-Palacios S.; Biagianti-Risbourg S.; Vernet G. Metallothionein induction related to hepatic structural perturbations and antioxidative defences in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to the fungicide procymidone // *Biomarkers* – 2003. – Vol. 8, № 2. – P. 128 – 141.
 22. Peña-Lopis S., Ferrando M. D., Peña J. B. Fish tolerance to organophosphate induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine // *Aquat. Toxicol.* – 2003. – Vol. 65, N 4. – P. 337-360.
 23. Petrovic V., Buzadzic B., Korac A. et al. Free radical equilibrium in interscapular brown adipose tissue: Relationship between metabolic profile and antioxidative defense // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2006. – Vol. 142C, № 1. – P. 60 – 65.
 24. Ruddock L. W., Klappa P. Protein folding with a novel redox switch // *Curr. Biol.* – 1999. – Vol. 3 – P. 400 – 402.
 25. Sen C. K. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants // *Biochem. Pharmacol.* – 1998. – 55. – P. 1747 – 1758.
 26. Stephensen E., Sturve J., Förlin L. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver // *Compar. Biochem. Physiol.* – 2002. – Vol. 133C, N 3. – P. 435 - 442.
 27. Stoliar O.B., Lushchak V.I. Environmental Pollution and Oxidative Stress in Fish. In Book: *Oxidative Stress – Environmental Induction and Dietary Antioxidants* / Ed. Lushchak V. InTech, 2012. 131–166.
 28. Thomas P., Juedes M. J. Influence of lead on the glutathione status of Atlantic croaker tissues // *Aquat. Toxicol.* 1992. – 23, № 1 - P. 11 - 30.
 29. Thomas P., Wofford H. W. Effect of metals and organic compounds on hepatic glutathione, cysteine and acid-soluble thiol levels in Mullet (*Mugil cephalus* L.) // *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* – 1984. – Vol. 76, № 1. – P. 172 – 178.
 30. Wang W., Ballatori N. Endogenous Glutathione conjugates: occurrence and biological functions // *Pharmacol. Rew.* 1998. – Vol. 50, № 3. – P. 335 – 356.
 31. Wang W.X., Rainbow P. Comparative approaches to understand metal bioaccumulation in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol*, 2008; 148C(4): 315–323.
 32. Wu R.S., Siu W.H., Shin P.K. Induction, adaptation and recovery of biological responses implications for environmental monitoring // *Mar Pollut Bull.* 2005. Vol.51, № 8-12. P.623-624

Мудра А.Е.

СОСТОЯНИЕ ГЛУТАТИОНА В ГЕПАТОЦИТАХ КАРПА И РАКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ПОВРЕЖДАЮЩИХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ.

Ключевые слова: карп чешуйчатый (*Cyprinitis carpio L.*), рак узкопалый (*Astacus leptodactylus*), глутатион, тяжелые металлы, фенол.

Исследование проводились на двухлетки карпа чешуйчатого (*Cyprinitis carpio L.*) массой 200 - 250 г) и взрослых особях рака узкопалого (*Astacus leptodactylus*) живой массой 50 ± 5 г . Для исследования мы использовали ионы металлов и фенол, которые являются распространенными загрязнителями пресных водоемов Украины. Определение содержания глутатиона в печени карпа показало, что около 90% его находится в восстановленной форме. Действие ЭПК всех исследуемых факторов на карпа вызывает повышение содержания как GSH, так и GSSG в печени. Однако рост содержания GSSG в ткани оказалось более значительным - его содержание в экспериментальных животных превышал значение контроля более чем в два раза. Особенно заметно редокс индекс глутатиона уменьшается по сравнению с контролем за действия на организм свинца За действия 2 ГДК факторов только медь вызывает достоверное уменьшение содержания GSH, а другие факторы не влияют на его содержание. Действие 5 ГДК металлов, наоборот, приводит к увеличению содержания GSH в ткани за действия цинка и свинца и не влияет на его содержание за действия других металлов. Содержание GSH в ткани рака выше в два раза, чем в ткани карпа За действия тяжелых металлов он растет против контроля, как и у карпа. Только действие фенола приводит к противоположному по сравнению с карпам ответы - уменьшение содержания GSH. Следовательно изменения, которые мы наблюдали в состоянии глутатиона у карпа и рака, могут делать существенный вклад в адаптации животных к рассматриваемым факторов.

Mudra A.Ye.

GLUTATHIONE STATE IN THE HEPATOCYTES OF CARP AND CRAYFISH UNDER THE EFFECT OF ENVIRONMENTAL DISTURBING FACTORS

Key words: carp (*Cyprinitis carpio L.*), crayfish (*Astacus leptodactylus*), glutathione, heavy metals, phenol.

The aim of our study was to compare state of glutathione system in liver at carp and, the representatives of two freshwater animals which are of great economic importance and belong to the same biotype but phylogenetically distant between each other. The investigation was conducted on carp (*Cyprinitis carpio L.*) (2 y. o., weight 200- 250 g) and adult individuals crayfish (*Astacus leptodactylus*) weight 50 ± 5 g. Metal ions and phenols, which are common contaminants of freshwater Ukraine, were studied. Determination of glutathione in the liver of carp showed that about 90% of its is in reduced form, that

corresponds with known information about this intracellular thiols. Action 0,1 MPC of all investigated factors on carp caused the increasing in the content of both GSH, and GSSG in the liver. However, the growing of GSSG content was more significant. Its content in experimental animals is greater than control more than doubled. Plumbum the most notably decreased compared with control glutathione redox index. In case of 2 MPC factors action only copper probable reduce GSH, and other factors do not affect the its content. Action 5 MPC metals, however, leads to the increasing of GSH content, the action of zinc and plumbum had no effect on its content. The content of GSH in the tissue crayfish was twice higher than in the tissue of carp. Under influence of heavy metals it increases versus control, as in the carp. Only phenol action opposite of compared to carp response - reduction of GSH. So the changes, that we observed in a state of glutathione in carp and crawfish, can make a significant contribution in the adaptation of animals to the studied factors. Thus, the analysis of glutathione in aquatic animals suggests that the effect of 0,1 MPC heavy metal ions has the same type of response in carp and crayfish, while the mechanism of changes of glutathione by the action of phenol in carp and reverse crayfish. Higher than 0,1MPC concentration of metal ions causes specific changes in the nature of the metal content of GSH. In total glutathione system in carp and crayfish is highly sensitive and selective to the action of heavy metals and phenol.