

**ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК ГЕПАТОПАНКРЕАСА
ПОД ВЛИЯНИЕМ ФАКТОРОВ СРЕДЫ С ПОМОЩЬЮ
МНОГОФАКТОРНОГО АНАЛИЗА**

Балаева-Тихомирова О.М., Чиркин А.А.

Балаева-Тихомирова О.М.

*Кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры химии
и естественнонаучного образования*

*УО «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова»,
г. Витебск, Беларусь
olgabal.tih@gmail.com*

Чиркин А.А.

*Доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры химии
и естественнонаучного образования*

*УО «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова»,
г. Витебск, Беларусь
alexchir43@gmail.com*

В данной статье с помощью многофакторного анализа произведена оценка влияния факторов среды обитания на активность ферментов аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы, как биохимических маркеров состояние клеток гепатопанкреаса легочных пресноводных моллюсков. Авторами исследования показана эффективность использования более простых организмов для изучения функциональных особенностей печени при внешнем воздействии. В ходе исследования выявлен положительный эффект ионов цинка на активность аланинаминотрансферазы и отрицательный эффект ионов железа и рН на активность аспаратаминотрансферазы у обоих видов моллюсков, отличающихся разными механизмами транспорта кислорода.

Ключевые слова: факторов среды; легочные моллюски; аланинаминотрансфераза; аспаратаминотрансфераза

ASSESSMENT OF THE CONDITION OF HEPATOPANCREAL CELLS UNDER THE INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS USING MULTIFACTORIAL ANALYSIS

Balaeva-Tikhomirova O.M.

*Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Chemistry and Natural Science Education of the Educational institution «Vitebsk State University named after P.M. Masherov», Vitebsk, Belarus
olgabal.tih@gmail.com*

Chirkin A.A.

*Doctor of Biological Sciences, Professor, Professor of the Department of Chemistry and Natural Science Education of the Educational institution «Vitebsk State University named after P.M. Masherov», Vitebsk, Belarus
alexchir43@gmail.com*

In this article, using multifactorial analysis, the influence of environmental factors on the activity of the enzymes alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase, as biochemical markers of the state of the cells of the hepatopancreas of pulmonary freshwater mollusks, was evaluated. The authors of the study have shown the effectiveness of using simpler organisms to study the functional features of the liver under external influence. The study revealed a positive effect of zinc ions on the activity of alanine aminotransferase and a negative effect of iron and pH ions on the activity of aspartate aminotransferase in both types of mollusks, which differ in different mechanisms of oxygen transport.

Key words: *environmental factors; pulmonary mollusks; alanineaminotransferase; aspartateaminotransferase*

Изучение биохимических изменений в организме животных и человека, происходящих под воздействием внешних факторов среды, является актуальной проблемой. Одним из органов наиболее подверженных данному влиянию является печень, в которой происходит обезвреживание чужеродных веществ, избытка гормонов, медиаторов, витаминов, а также токсичных промежуточных и конечных продуктов обмена веществ синхронно с регуляцией обмена веществ [1]. Ранее была установлена возможность использования для оценки влияния факторов различной природы на биохимические процессы в организмах более простых животных — легочных пресноводных моллюсков (катушка роговая и прудовик обыкновенный), что подтверждено исследованиями молекулярно-структурной гомологии ряда ферментов [2, 3]. У легочных пресноводных моллюсков печень представлена гепатопанкреасом (пищеварительной железой), который содержит клетки, выполняющие функции внутриклеточного переваривания, всасывания и хранения питательных веществ. Гепатопанкреас участвует в защитных реакциях организма и противодействует развитию окислительного стресса. При выполнении своей основной функции печень у млекопитающих и гепатопанкреас у беспозвоночных подвергаются функциональным нарушениям, что часто регистрируется изменениями количества и активности ферментов ала-

нинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ). Поэтому активности АЛТ и АСТ относятся к маркерам функционального состояния печени, нарушений проницаемости мембран гепатоцитов и нарушений метаболических процессов, связанных с развитием окислительного стресса [4].

Цель работы — оценить влияние факторов среды обитания на активность ферментов аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы, как биохимических маркеров состояние клеток гепатопанкреаса легочных пресноводных моллюсков.

Материал и методы исследования. В работе использовались два представителя легочных пресноводных моллюсков — 216 особей прудовика обыкновенного (*Lymnaea stagnalis*) и 216 особей катушки роговой (*Planorbarius corneus*). Материалом для исследования были гемолимфа и гепатопанкреас половозрелых моллюсков. Легочные пресноводные моллюски были отловлены в 5 водоемах Витебской области (р. Витьба г. Витебск; оз. Вордовье д. Ляды; оз. Дубровское д. Дубровка; оз. Будовесть а/г Башни; оз. Селявское д. Селявщина) и 3 водоемах Гомельской области (оз. Любенское г. Гомель; р. Припять д. Красная Горка; р. Друть г. Рогачёв), отличающихся различными климатическими и антропогенными характеристиками.

Физико-химические показатели среды обитания были определены спектрофотометрическими, титрометрическими и электрохимическими методами. Было установлено содержание в воде ионов Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , NH_4^+ , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , карбонатная и общая жесткости, pH; в прибрежной почве водоемов содержание ионов Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} и активности ферментов — каталазы, протеазы и уреазы. У моллюсков спектрофотометрическим методом была определена активность в гемолимфе и гепатопанкреасе аланинаминотрансферазы (АЛТ, $n = 216$), аспартатаминотрансферазы (АСТ, $n = 216$).

Анализы выполнены в статистической среде R (пакеты *vegan*, *labdsv* и *car*) [5]. Для оценки влияния измеренных показателей среды на основные показатели метаболизма, выражено значение индекса Шеннона, применен регрессионный анализ, перед которым переменные, выраженные в процентах, были подвержены преобразованию (*arcsine*). Модель наилучшим образом, описывающую выявленные зависимости, была выбрана методом пошагового исключения переменных, основываясь на значении информационного критерия Акаике (*Akaike information criterion* — *AIC*). Мультиколлинеарность отдельных независимых переменных среды обусловило выбор обобщенной модели множественной регрессии (*Generalized Linear Models* — *GLM*) с распределением Пуассона (*Poisson distribution*). Предварительно была выполнена проверка на избыточную дисперсию (*overdispersion*), которая может исказить ход анализа. Если таковая была обнаружена, стандартная ошибка корректировалась выбором распределения квази-Пуассона (*quasi-Poisson*) [6].

Результаты и их обсуждение. По результатам исследования активность ферментов АСТ и АЛТ изменялась в широком диапазоне как в гемолимфе, так и гепатопанкреасе двух видов моллюсков. В гепатопанкреасе зафиксировано колебание показателей у катушки роговой от 53,8 до 698,5 Ед/л (АСТ), от 44,2 до 535,5 Ед/л (АЛТ), у прудовика обыкновенного от 43,9 до 694,6 Ед/л (АСТ), от 32,6 до

378,5 Ед/л (АЛТ). Сходные изменения активности ферментов выявлены в гемолимфе и составили у катушки роговой от 22,51 до 67,456 Ед/л (АСТ), от 11,87 до 72,25 Ед/л (АЛТ), у прудовика обыкновенного от 25,93 до 75,32 Ед/л (АСТ), от 10,71 до 62,21 Ед/л (АЛТ). Активность ферментов подвержена сезонным изменениям и связана с активностью метаболизма, выходом и входом моллюсков в состояние анабиоза. Также на активность ферментов влияют антропогенные и климатические факторы. Соотношение АЛТ/АСТ у пресноводных легочных моллюсков позволяет определить степень адаптации или патологии организма при воздействии неблагоприятных условий.

Оценка влияния переменных среды обитания на активность ферментов в тканях легочных пресноводных моллюсков представлены в таблицах 1, 2.

Таблица 1

Влияние переменных среды на активность ферментов в тканях прудовика обыкновенного

Переменная среды	Коэффициент	Стандартная ошибка	Значения критериев Вальда (z) и Стьюдента (t)	Р-уровень
Влияние на активность АЛТ в гепатопанкреасе				
Свободный член (Intercept)	-3.514	1.951	-1.801	н.з.
Fe ³⁺ мг/г (почва)	0.621	0.493	1.259	н.з.
Zn ²⁺ мг/г (почва)	0.753	0.307	2.455	*
Активность каталазы (см ³ О ₂ /г за 1 мин (почва))	-0.766	0.508	-1.508	н.з.
Активность протеазы (мг альбумина/10 г за 24 ч (почва))	0.040	0.284	0.141	н.з.
Fe ³⁺ мг/л (вода)	-0.065	0.327	-0.198	н.з.
Общая жесткость воды (мг-экв/л)	-0.193	0.479	-0.403	н.з.
Карбонатная жесткость воды (мг-экв/л)	0.454	0.437	1.039	н.з.
pH	3.269	1.895	1.725	н.з.
Влияние на активность АСТ в гепатопанкреасе				
Свободный член (Intercept)	0.0004	0.0001	3.350	***
Fe ³⁺ мг/г (почва)	0.0001	0.0003	0.453	н.з.
Zn ²⁺ мг/г (почва)	0.0009	0.0001	0.516	н.з.
Активность каталазы (см ³ О ₂ /г за 1 мин (почва))	0.0004	0.0003	0.0001	н.з.
Активность протеазы (мг альбумина/10 г за 24 ч (почва))	0.0001	0.0001	0.827	н.з.
Fe ³⁺ мг/л (вода)	-0.0004	0.0002	-2.216	*
Общая жесткость воды (мг-экв/л)	-0.0002	0.0003	-0.895	н.з.
Карбонатная жесткость воды (мг-экв/л)	0.0002	0.0002	1.009	н.з.
pH	0.0004	0.0001	-3.708	***

Примечание. Уровень значимости (p): *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05; н.з. — нет значимого влияния (p > 0,05)

Из таблицы 1 следует, что на активность АЛТ в гепатопанкреасе прудовика обыкновенного значимо ($p < 0,05$) влияло содержание ионов цинка в почве прибрежной зоны водоема (положительный эффект). Все остальные переменные среды не оказывали значимого влияния ($p > 0,05$). Обобщенные модели множественной регрессии для прудовика обыкновенного показали достоверное влияние ($p < 0,05$) на активность АСТ содержания ионов железа в воде и рН (отрицательный эффект), всех остальные переменные среды значимого влияния на данный показатель не оказывали ($p < 0,05$).

Таблица 2

Влияние переменных среды на активность ферментов в тканях катушки роговой

Переменная среды	Коэффициент	Стандартная ошибка	Значения критериев Вальда (z) и Стьюдента (t)	р-уровень
Активность АЛТ в гепатопанкреасе				
Свободный член (Intercept)	-1.612	1.393	-1.157	н.з.
Cu ²⁺ мг/г (почва)	0.112	0.322	0.348	н.з.
Zn ²⁺ мг/г (почва)	0.524	0.190	2.761	**
Активность каталазы (см ³ O ₂ /г за 1 мин (почва))	-0.074	0.342	-0.216	н.з.
Активность протеазы (мг альбумина/10 г за 24 ч (почва))	-0.046	0.214	-0.214	н.з.
Cu ²⁺ мг/л (вода)	0.138	0.271	0.511	н.з.
Общая жесткость воды (мг-экв/л)	-0.261	0.458	-0.569	н.з.
Карбонатная жесткость воды (мг-экв/л)	0.261	0.359	0.727	н.з.
Влияние на активность АСТ в гепатопанкреасе				
Свободный член (Intercept)	0.0003	0.0001	1.514	н.з.
Fe ³⁺ мг/г (почва)	0.0001	0.0002	0.251	н.з.
Zn ²⁺ мг/г (почва)	0.0008	0.0001	0.312	н.з.
Активность каталазы (см ³ O ₂ /г за 1 мин (почва))	0.0003	0.0002	0.0001	н.з.
Активность протеазы (мг альбумина/10 г за 24 ч (почва))	0.0001	0.0001	0.625	н.з.
Fe ³⁺ мг/л (вода)	-0.0003	0.0002	-2.145	*
Общая жесткость воды (мг-экв/л)	-0.0001	0.0002	-0.793	н.з.
рН	0.0004	0.0001	-2.204	***

Примечание. Уровень значимости (р): *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; н.з. — нет значимого влияния ($p > 0,05$)

Из таблицы 2 видно, что обобщенные модели множественной регрессии для катушки роговой показали отсутствие достоверного влияния ($p > 0,05$) всех измеренных переменных на активность АЛТ в гепатопанкреасе, за исключением одной переменной — содержания цинка в почве (положительный эффект; $p < 0,05$). На активность АСТ оказывали влияние две переменные среды — содержания ионов железа в воде и рН (отрицательный эффект), всех остальные переменные среды значимого влияния на данный показатель не оказывали ($p < 0,05$).

Таким образом, выявлены сходные изменения активности ферментов в гепатопанкреасе двух видов моллюсков. Также в эксперименте установлено, что ионы цинка содержатся в большом количестве в прибрежной почве (от 29,3 до 144,5 мг/г) водоемов Республики Беларусь, и посредством диффузии попадают в природную воду. Многофакторный анализ и построенные обобщенные модели множественной регрессии установили положительный эффект ($p < 0,05$) концентрации ионов цинка в почве на активность АЛТ у обоих видов моллюсков. Такого эффекта на активность АСТ не зафиксировано. Цинк играет важную роль в метаболических процессах и регулирует структурную целостность клеток печени. Низкая концентрация цинка может снижать активность АЛТ, а также его уровень коррелирует с патологическими процессами и нарушением гомеостаза. Механизм влияния цинка на активность АЛТ основан на аллостерической регуляции и стабилизации структуры белка. Цинк выступает кофактором, участвуя в метаболизме белков и стабилизируя структуру клеточных мембран гепатоцитов, что предотвращает увеличение активности АЛТ в гемолимфе. Цинк участвует в обеспечении активности витамина В₆, который является кофактором реакции трансминирования, регулируемой АЛТ.

На активность АСТ выявлено влияние ионов железа в воде и величины рН. Такое действие ионов железа связано с возможностью их функционирования как кофакторов, которые меняют структуру активного центра, его конформацию и влияют на скорость переноса аминокрупп. Также железо, как тяжелый металл, способно изменять третичную структуру АСТ, что меняет её способность катализировать реакции. Высокая концентрация ионов железа в воде влияет на рН и как следствие на стабильность фермента. Водородный показатель, в свою очередь, изменяет ионизацию фермента в его активном центре и значения рН оптимальные для функционирования в нейтральной области. Выявлено, что значение рН в исследуемых водных экосистемах изменяется в пределах 6,5–8,5 и подвержено сезонным колебаниям, что, вероятно, отражается на активности фермента АСТ.

Заключение. С помощью многофакторного анализа проведена оценка влияния факторов среды обитания на активность ферментов аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы, как биохимических маркеров состояния клеток гепатопанкреаса легочных пресноводных моллюсков. Установлена эффективность использования двух видов гидробионтов для изучения функциональных особенностей гепатопанкреаса (печени) при внешнем воздействии. Выявлено, что статистически значимое влияние на активность аланинаминотрансферазы оказывает, только концентрация ионов цинка в прибрежной зоне водоемов. Данное влияние основано на возможностях цинка связываться с регуляторными центрами АЛТ изменять конформацию и каталитическую активность фермента. Определено, что на активность фермента АСТ у обоих видов моллюсков отрицательный эффект оказывает содержание ионов железа в воде и рН среды. Это обусловлено влиянием ионов железа как кофактора или тяжелого металла меняющего структуру фермента и способности к ионизации при сдвиге рН из нейтральной области. Таким образом, по результатам построения обобщен-

ных моделей множественной регрессии факторами, влияющими на функциональное состояние клеток гепатопанкреаса (печени) являются содержание ионов цинка, железа и pH среды.

Список литературы

1. Функциональные особенности печени / А.В. Синдирева [и др.] // Вестник КрасГАУ. – 2024. – № 9. – С. 121–127.
2. Использование легочных пресноводных моллюсков для изучения нарушений обмена веществ / А.А. Чиркин [и др.] // Новости медико-биологических наук. – 2024. – Т. 24, № 2. – С. 90–97.
3. Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов в изучении механизма протеолиза и его регуляции / А.А. Чиркин [и др.] // Весці НАН Беларусі. Серыя хім. навук. – 2021. – Т. 57 – №. 2. – С. 206–2017.
4. Морфология, физиология и патология органов кровообращения и дыхания животных / К.А. Сидорова [и др.]. Тюмень: ГАУ Северного Зауралья, 2021. – 289 с.
5. Zuur A.F., Ieno E.N., Elphick C.S. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems // *Methods. Ecol. Evol.* – 2010. – Vol. 1. – P. 3–14.
6. Сушко Г. Г. Дисперсионный анализ с использованием программного обеспечения PAST 4.04 // Веснік ВДУ імя П.М. Машэрава. – 2021. – № 1. – С. 64–73.