

УДК 577.124.5 : 597.551.2 : 574.64+612.014.43

ВПЛИВ ЗЕНКОРУ НА ВМІСТ ГЛЮКОЗИ ТА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗУ У ТКАНИНАХ КОРОПА ЛУСКАТОГО (*Cyprinus carpio* L.) ЗА РІЗНИХ ТЕМПЕРАТУР

О. Б. МЕХЕД, Б. В. ЯКОВЕНКО, А. О. ЖИДЕНКО

Чернігівський державний педагогічний університет ім. Т. Г. Шевченка, Україна;
e-mail: imc@chspu.edu.ua

*Изучено влияние низких температур и пестицидного токсикоза как отдельно, так и при одновременном их действии на динамику содержания глюкозы в различных органах и возможность ее образования путем глюконеогенеза в организме карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio* L.). При снижении температуры среды происходит незначительное увеличение активности ферментов глюконеогенеза. Снижение уровня глюкозы в тканях с одновременным усилением активности ферментов необратимых реакций глюконеогенеза как результат действия зенкора (4-амино-6-третбутил-3-(метилтио)-1,2,4-триазин-5(4H)-он) при 5–6 и 13–14 °C свидетельствует об активном катаболическом использовании углевода для потребностей организма рыб, в частности для двигательной деятельности. По завершении процесса зимнего голодания организм рыб истощен, поэтому при токсикозе, вызванном зенкором, использование различных метаболитов для активного синтеза глюкозы, необходимой для энергетических потребностей рыб, особенно при низких температурах, может привести к еще большему его истощению, а возможно и к гибели.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: карп, глюкоза, глюкозо-6-фосфатаза, фруктозо-1,6-дифосфатаза, зенкор, низкие температуры.

Упойкліотермних організмів, до яких належить короп лускатий (*Cyprinus carpio* L.), вуглеводи відіграють суттєву роль в енергетичному обміні нервової тканини, червоних кров'яних тілець, статевих залоз. Це досить лабільні й легко мобілізовані енергетичні субстрати, що використовуються як в аеробних, так і в анаеробних умовах. Синтез вуглеводів із різних субстратів є необхідною умовою оптимальної діяльності м'язової та нервової систем. Існують дані щодо дослідження динаміки вмісту вуглеводів та рівня активності ферментів їхнього обміну у морських та прісноводних видів риби протягом зимівлі [1] залежно від температури води [2], під час голодування та в умовах токсикозу, спричиненого органічними і неорганічними речовинами [3, 4], у тому числі пестицидами [5, 6].

Розвиток сільського господарства та загальне зростання антропогенного впливу на водне середовище загострило проблему виживання водних тварин, зокрема риби, в умовах забруднення пестицидами.

На полях Чернігівської області широко використовуються пестициди групи триазинів, а саме зенкор – гербіцид, який застосовується для знищення однолітніх дводольних і злакових бур'янів на помідорах і картоплі. У водойми цей пестицид потрапляє з дощовими та поливними водами і становить небезпеку для риби, особливо

для мальків, оскільки призводить до змін в обміні у них нуклеїнових кислот [7]. Гранично допустима концентрація зенкору для водойм – 0,1 мг/л [7]. У доступній нам літературі не висвітлене питання щодо активності ферментів глюконеогенезу та динаміки вмісту вуглеводів, зокрема основного моносахариду – глюкози, під впливом вищезазначеного гербіциду. Також важливим, але недостатньо вивченим, залишається комплексний вплив антропогенних та абіотичних факторів, оскільки у природних умовах вони, як правило, діють одночасно.

Метою роботи було дослідження вмісту глюкози і активності ферментів глюконеогенезу за низьких температур та токсичного впливу зенкору, як окремо так і за їхньої одночасної дії.

Матеріали і методи

Роботу проведено на дворічках коропа лускатого різної статі з масою тіла 200–250г, довжиною 21–26 см. Риби тримали в умовах стандартного газового та гідрохімічного режиму, фотоперіод – 13,5 світлових год. Для проведення експериментів тварин було поділено на 4 групи: риби першої групи (А) були аклімовані до температури 13–14 °С, другої (В) – до цієї самої температури за присутності зенкору, третю і четверту групи риби утримували при 5–6 °С (температурний режим підтримували штучно завдяки дода-

ванню льоду) відповідно у чистій воді (С) за внесення 70%-го порошку до концентрації 0,2 мг/л води. Період акліматії становив 14 діб, рН води — 7,3–7,8. Дослідження проводили у квітні 2003 року.

Для аналізу використовували білі м'язи, печінку і мозок коропа. Активність глюкозо-6-фосфатази (3.1.3.9, Г-6-Фаза) та фруктозо-1,6-дифосфатази (3.1.3.11, Ф-1,6-ДФаза) визначали у надосадовій фракції гомогенату цих органів, одержаних після відокремлення ядер, уламків клітин (600 г, 15 хв) та мітохондрій (15 000 г, 25 хв). Їхню ферментативну активність оцінювали за кількістю утвореного ортофосфату [8, 9]. Реакційна суміш для визначення Г-6-Фази складалась з 0,3 мл 0,087 М цитратного буфера (рН 6,5); 0,1 мл глюкозо-6-фосфата. Через 3 хв преінкубації додавали 0,2 мл досліджуваного ферментного препарату та інкубували 30 хв. Реакцію зупиняли додаванням 1 мл 10% ТХО і ставили на лід. Через 5 хв одержану суміш розводили дистильованою водою до 2,5 мл, осад білка відділяли центрифугуванням, а в одержаному супернатанті визначали неорганічний фосфор.

Аналогічно визначали активність Ф-1,6-ДФази, але інкубаційна суміш складалась з 0,5 мл 0,2 М трис-НСІ-буфера (рН 7,5); 0,3 мл 0,1 М MgCl₂; 0,15 мл фруктозо-1,6-дифосфата. Контролем була проба, в яку ТХО добавляли до початку реакції. Кількісно ортофосфат визначали за Фіске-Саббароу в модифікації [10, 11]. Ферментативну активність виражали в мкмольях неорганічного фосфору (P_i) за 1 хв на 1 мг білка. Використовували реактиви фірм «Reanal» (Угорщина), «Хімлаборреактив» та «Реагент» (Україна).

Кількість білка у пробах визначали за методом Лоурі [12], вміст глюкози — фотометричним методом, вимірюючи інтенсивність кольорової реакції з *o*-толуїдиновим реактивом [13]. Одержані дані опрацьовані статистично за І. О. Ойвіним [14], визначали коефіцієнт *t*-Стьюдента, достовірними вважали результати при $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення

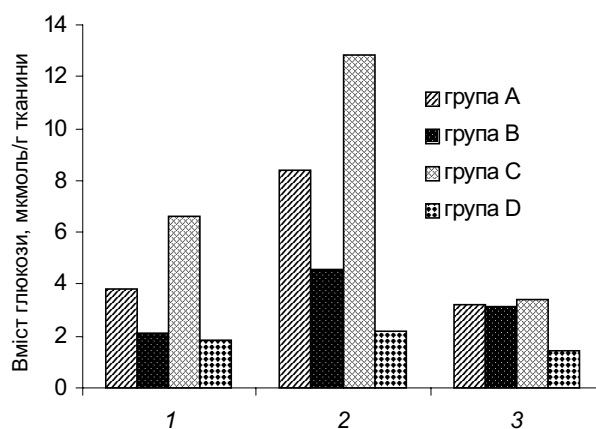
Результати досліджень свідчать, що найвищий рівень глюкози спостерігається в печінці коропа і залежить від температури води (рисунок, А, С). При температурі 13–14 °С концентрація її в цьому органі становить $8,40 \pm 0,90$, а при 5–6 °С — зростає до $12,82 \pm 0,33$ мкмоль/г тканини. Суттєво впливає температура і на рівень глюкози в білих м'язах риб. В умовах високих температур він становить $3,80 \pm 0,10$, а у разі зниження температури води до 5–6 °С зростає до $6,63 \pm 0,61$ мкмоль/г тканини ($p \leq 0,01$). Що стосується тканини мозку, то на вміст даного

метаболіту температура майже не впливає: $3,23 \pm 0,63$ при 13–14 °С та $3,44 \pm 0,22$ мкмоль/г тканини при 5–6 °С.

Суттєві зміни щодо вмісту глюкози спостерігаються за присутності зенкору при обох температурах. При більш високій температурі (рисунок, група В) вміст глюкози в печінці зменшується в 1,82 раза порівняно з рибами групи А і становить $4,60 \pm 0,88$ ($p \leq 0,02$). За дії зенкору при 13–14 °С майже вдвічі знижується вміст глюкози в білих м'язах риб ($2,10 \pm 0,31$ проти $3,81 \pm 0,10$ мкмоль/г тканини за відсутності зенкору, $p \leq 0,001$). При цій самій температурі вміст глюкози в мозку риб за присутності застосованого токсиканту залишився без змін.

Найбільші зміни щодо вмісту глюкози в досліджуваних тканинах риб спостерігаються при температурі води 5–6 °С та за присутності токсиканту (рисунок, група D). Майже в 6 разів зменшилась кількість вуглеводу в печінці ($2,16 \pm 0,10$ за присутності зенкору проти $12,8 \pm 0,3$ мкмоль/г тканини без гербіциду) Суттєво змінився вміст глюкози в білих м'язах риб ($1,81 \pm 0,30$ в той час, як без зенкору — $6,63 \pm 0,61$ мкмоль/г тканини). Достовірно менше виявлено глюкози і в мозковій тканині риб ($1,41 \pm 0,10$ проти $3,44 \pm 0,22$ мкмоль/г тканини). Слід відзначити, що на рівень глюкози в мозку риб не впливає окремо ні низька температура, ні пестицид.

Таким чином, порівнюючи дані дослідів в групах В і D, в яких застосовано зенкор, слід зазначити, що суттєвий вплив на вміст глюкози в досліджуваних тканинах має температурний фактор: при зниженні температури води до 5–6 °С вплив зенкору посилюється, що викликає значне зменшення рівня вуглеводу в усіх тканинах.



Вміст глюкози в тканинах коропа лускатого, мкмоль/г тканини ($M \pm m$, $n = 6$): 1 — м'язи; 2 — печінка; 3 — мозок.

Зміни кількості глюкози у тканинах риб можна пов'язувати як зі змінами активності ферментів катаболізму вуглеводів, так і інтенсивності їхнього утворення. Зокрема літературні дані свідчать про можливість синтезу вуглеводів із білків та ліпідів у риб, що голодували довгий час [15]. Тому доцільним було вивчити активність основних ферментів глюконеогенезу – Г-6-Фази та Ф-1,6-ДФази. Результати дослідження викладено в таблиці.

Максимальна активність обох ферментів у риб групи А спостерігається в печінці, де вона становить $0,183 \pm 0,034$ та $0,170 \pm 0,018$ мкмоль P_i /хв на 1 мг білка для Г-6-Фази і Ф-1,6-ДФази відповідно. Значно меншою Г-6-Фазною активністю відрізняються м'язи та мозок риб. Стосовно Ф-1,6-ДФази, картина дещо інша: якщо в мозку активність ферменту в 8,5 раза менша порівняно з таким показником у печінці, то в м'язах вона майже така сама, як і в печінці. Деякі автори [16, 17] пов'язують високу активність ферменту в м'язах із функціонуванням субстратного циклу між фруктозо-6-фосфатом і фруктозо-1,6-дифосфатом.

Аналіз даних, одержаних за вивчення риб, яких витримували при температурі 13–14 °С, свідчить, що чутливими до застосованого гербіциду є Ф-1,6-ДФаза всіх органів та Г-6-Фаза печінки і м'язів. Обидва ферменти відповідають на дію токсиканту підвищенням активності. Максимальне збільшення активності ферментів спостерігається в печінці і становить відповідно для Г-6-Фази – $0,437 \pm 0,037$ проти $0,183 \pm 0,034$ мкмоль P_i /хв на 1 мг білка в контролі, а для Ф-1,6-ДФази – $0,438 \pm 0,084$ проти $0,170 \pm 0,018$ мкмоль P_i /хв на 1 мг білка. Неоднозначно реагують ферменти глюконеогенезу на зменшення температури з 13–14 °С до 5–6 °С. Якщо активність Г-6-Фази м'язів практично не змінюється,

то в печінці та в мозку спостерігається підвищення Г-6-Фазної активності, хоча відмінності не достовірні (таблиця). Аналогічно незначним зростанням активності ферменту в усіх досліджуваних тканинах можна охарактеризувати Ф-1,6-ДФазу: у процентному співвідношенні це виражається для м'язів – 14%, печінки – 41%, мозку – 45% порівняно з контролем. Таким чином, в умовах зниження температури навколишнього середовища відбувається незначне збільшення активності ферментів глюконеогенезу.

І, нарешті, активність обох ферментів достовірно змінюється у відповідь на одночасний вплив токсиканту і температури 5–6 °С (група D). Для всіх тканин це виявляється в істотному збільшенні активності як Г-6-Фази, так і Ф-1,6-ДФази порівняно з цим показником у риб групи С, що свідчить про підвищення потенціалу активації анаболічних реакцій, спрямованих на синтез глюкози й енергозабезпечення тканин. Зокрема, в білих м'язах різниця активності першого ферменту складає 2,17 раза ($p \leq 0,001$), а другого – 2,62 раза ($p \leq 0,01$). Аналогічні зміни визначено в печінці, де активація Г-6-Фази складає $0,456 \pm 0,031$ проти $0,237 \pm 0,043$ мкмоль P_i /хв на 1 мг білка ($p \leq 0,001$), а Ф-1,6-ДФази – $0,416 \pm 0,008$ проти $0,240 \pm 0,020$ мкмоль P_i /хв на 1 мг білка ($p \leq 0,001$). У 1,26 раза більшою активністю порівняно з групою С характеризується Г-6-Фаза мозку риб групи D, та в 2,1 раза – Ф-1,6-ДФаза.

Слід звернути увагу на те, що, незважаючи на вищу активність Ф-1,6-ДФази та Г-6-Фази в досліджуваних тканинах риб, які перебували у воді за присутності зенкору, рівень глюкози в них (за винятком мозку при 13–14 °С) значно нижчий, ніж у риб у воді без токсиканту. Це свідчить про інтенсивне використання глюкози на енергетичні потреби. Власні спостереження за

Активність цитоплазматичних глюкозо-6-фосфатази та фруктозо-1,6-дифосфатази у тканинах коропа лускатого в умовах експерименту, мкмоль P_i /хв на 1 мг білка, $M \pm t$, $n = 6$

Орган	Група риб в умовах експерименту			
	А	В	С	Д
<i>Цитоплазматична глюкозо-6-фосфатаза</i>				
Білі м'язи	$0,091 \pm 0,002$	$0,172 \pm 0,012^*$	$0,090 \pm 0,001$	$0,196 \pm 0,012^*$
Печінка	$0,183 \pm 0,034$	$0,437 \pm 0,037^*$	$0,237 \pm 0,043$	$0,456 \pm 0,031^*$
Мозок	$0,031 \pm 0,001$	$0,060 \pm 0,016$	$0,046 \pm 0,008$	$0,058 \pm 0,001^*$
<i>Цитоплазматична фруктозо-1,6-дифосфатаза</i>				
Білі м'язи	$0,160 \pm 0,017$	$0,210 \pm 0,013^*$	$0,183 \pm 0,019$	$0,480 \pm 0,066^*$
Печінка	$0,170 \pm 0,018$	$0,438 \pm 0,084^*$	$0,240 \pm 0,020^*$	$0,416 \pm 0,008^*$
Мозок	$0,020 \pm 0,001$	$0,061 \pm 0,012^*$	$0,029 \pm 0,008$	$0,061 \pm 0,010^*$

* Відмінності показників між групами А і В та С і D достовірні.

поведінкою риб груп В і D показали, що вони відрізняються від інших активними рухами (можливо у пошуках їжі). Цілком можливо, що така поведінка риб є характерною відповіддю на отруєння. Цей висновок підтверджується даними В. І. Лук'яненко стосовно поведінки риб у розчинах отрут органічного походження [18].

Для забезпечення глюкозою організму риб з токсикозом шляхом глюконеогенезу можна використовувати, як відомо, різні субстрати – гліцерол, глюкогенні амінокислоти, лактат, піруват [19]. Дослідження багатьох авторів свідчать, що в період зимового голодування риб зростає активність протеолітичних ферментів, ферментів дезамінування амінокислот, для енергетичних потреб використовуються жири, білки м'язів, вільні амінокислоти [19, 20].

Пропонується подальше вивчення реакцій глюконеогенезу в умовах одночасної дії несприятливих умов антропогенного та абіотичного характеру в організмі коропа лускатого та можливості використання запасних енергетичних субстратів для утворення глюкози за присутності інших токсикантів.

**EFFECT OF ZENCORE
ON THE AMOUNT OF GLUCOSE
AND ACTIVITY OF GLUCONEOGENESIS
ENZYMES IN CARP'S (*Cyprinus carpio* L.)
TISSUES AT DIFFERENT
TEMPERATURES**

*O. B. Mekhed, B. V. Yakovenko,
A. O. Zhidenko*

Shevchenko Chernigiv State Pedagogical University,
Ukraine;
e-mail: imc@chspu.edu.ua

S u m m a r y

The dynamics of glucose and activity of glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-biphosphatase (enzymes of gluconeogenes proceeding in carp's liver, muscles and brain) has been examined under conditions of low temperature and under the influence of 4-amino-6-(tert-butyl)-3-methyltio-4,5-dihydro-1,2,4-triazyne-5-one. The level of activity of basic enzymes of gluconeogenes increases and glucose amount decreases under the decrease of temperature and changes in toxicological conditions.

К е у w o r d s: *Cyprinus carpio*, glucose, glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-biphosphatase, 4-amino-6-(tert-butyl)-3-methyltio-4,5-dihydro-1,2,4-triazyne-5-one, low temperature.

1. Явоненко О. Ф., Грубінко В. В., Жиденко А. О. // Рибне господарство. 1993. **47**. С. 18–21.
2. Малиновская М. В. Особенности липидного и углеводного обмена у карпа (*Cyprinus carpio* L.) при температурной акклимации. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. К.: 1988. 17 с.
3. Коваль В. А., Яковенко Б. В. // Гидробиол. журн. 2000. **36**, № 2. С. 95–99.
4. Коваль В. О., Яковенко Б. В. // Наукові записки Тернопільського пед. ун-ту ім. В. Гнатюка. Серія: Біологія, спец. випуск: Гідро-екологія. 2001. **15**, № 4. С. 51–52.
5. Sancho E., Ferrando M. D., Andreu E. // J. Environ. Sci. Health. B. 1998. **33**, N 4. P.411–424.
6. Sancho E., Ferrando M. D., Fernandez C., Andreu E. // Ecotoxicol. Environ. Safety. 1998. **41**, N 2. P. 168–175.
7. Справочник по пестицидам: гигиена применения и токсикология / Под ред. А. В. Павлова. К.: Урожай. 1986. 432 с.
8. Львова С. П. // Укр. биохим. журн. 1985. **57**, № 1. С. 36–41.
9. Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. М.: Медицина. 1964. 345 с.
10. Эль-Марди Эль-Самани Эль-Хасан, Антонов М. П. // Укр. биохим. журн. 1968. № 5. С. 742–744.
11. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии: Учеб. пособие для студентов биологических специальностей университетов. М.: Высш. школа. 1980. 272 с.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. I. Farr A. I., Rendall R. I. // J. Biol. Chem. 1951. **193**, N 1. P. 265–275.
13. Ємельяненко С. М., Каданер Л. І., Комарова О. А. Хімія і біологічна хімія.: Практикум. К.: Вища шк. 1988. 206 с.
14. Ойвин И. А. // Патол. физиол. эксперим. терапия. 1960. № 4. С. 76–85.
15. Walton M. J., Cowey C. V. // Comp. Biochem. Physiol. 1982. **73**, N 1. P. 59–79.
16. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма. М.: Мир. 1977. 407 с.
17. Crabtree B., Newsholme E. A. // Biochem. J. 1972. **126**. P.49–58.
18. Лукьяненко В. И. Экологические аспекты ихтиотоксикологии. М.: ВО "Агропромиздат". 1987. 240с.
19. Cornish I., Moon T. W. // Am. J. Physiol. 1985. **249**. P. 67–72.
20. Сорвачев К. Ф. Основы биохимии питания рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность. 1982. 247 с.

Отримано 01.09.2003