

ЧЕРНІГІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ ІНСТИТУТ
ІМ. Т.Г.ШЕВЧЕНКА
ЧЕРНІГІВСЬКЕ ВІДДІЛЕННЯ УКРАЇНСЬКОГО БІОХІМІЧНОГО
ТОВАРИСТВА
ВІДДІЛ ЕКОЛОГІЇ ТА ЕКОНОМІКИ ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ
ЧЕРНІГІВСЬКОГО МІСЬКВИКОНКОМУ

ЕКОЛОГІЯ, ОХОРОНА ПРИРОДИ, ЕКОЛОГІЧНА ОСВІТА І
ВИХОВАННЯ

ЗБІРНИК
статей, присвячених 80-річчю Чернігівського державного
педагогічного інституту ім. Т.Г.Шевченка

Чернігів - 1996

заходів та шляхів оптимізації екологічної ситуації і заходів природоохоронного спрямування.

4. Цілеспрямованого пошуку фармакологічних, трофічних і психофізіологічних засобів корекції та підвищення толерантності стапу біосистем в умовах надпорогового впливу фактору.
5. Питання адаптації виступають органічною ланкою взаємозв'язку загальнонаукових уявлень про співвідношення і роль в макроеволюції неживої і живої субстанції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вайнерт Э., Вальтер Р., Ветцель Т. и др. Биомониторинг загрязнения наземных экосистем. - М.: Мир, 1988. - 350с.
2. Дедю И.И. Экологический словарь. - Кишинев: ШТИИЦА, 1992. - 380с.
3. Кочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. - М.: Мир, 1988. - 568с.
4. Проссер К.Л. Сравнительная физиология животных. - М.: Мир, 1973. - 430с.
5. Хлебович В.В. Акклимация животных организмов. - Л.: Наука, 1981. - 135с.
6. Уголев М.А. Принципы организации и эволюции биологических систем // Журн. эвол. биох. и физиол. - 1989. - 25, 2. - С.215-233.
7. Филенко О.Ф. Некоторые универсальные закономерности действия химических агентов на водные организмы // Автор. дисс.... докт. биол. наук. - М., 1990. - 36с.
8. Грубинко В.В. Адаптивні реакції риб до дії аміаку водного середовища // Автореф. дис.... докт. біол. наук. - Київ, 1995. - 44с.

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ АДАПТАЦІЇ СТАВКОВИХ РИБ ДО ЕКСТРЕМАЛЬНИХ ФАКТОРІВ СЕРЕДОВИЩА І ЇХ КОРЕКЦІЯ.

Грубинко В.В., Жиденко А.О., Смольский О.С., Леус Ю.В., Коновець І.М., Явоненко О.Ф.

В даний час у промисловому прісноводному ставковому рибництві виробничі втрати товарної риби складають від 10 до 25%, в основному, за рахунок загибелі молоді риб під час низькотемпературного змороженого голодування, при виході із зимівлі та у результаті дії несприятливих лідрохімічних факторів (гіпоксія, токси-

кови і ін.). Рибогосподарські засоби корекції несприятливого стану риб розроблено, однак проблемою є вчасна індикація розвитку порушень обміну речовин і гомеостазу в організмі риб та виявлення порогових значень дії зовнішніх факторів. Гідрохімічний аналіз, як правило, констатує наявність глибоких порушень, за яких корекція стану риб уже неможлива. Виникає потреба у методичному володінні такими засобами і показниками розвитку патології, які були б випереджуваними і давали можливість прогнозувати порушення ще задовго до глибокого розвитку патології. В даний час останні не розроблено і їх пошук є актуальним. Крім того, організм риб чутливий до найменших змін екологічного стану довкілля, що дозволяє використовувати гідробіонтів як засіб біоіндикації забруднення навколишнього, головню водного, середовища. За зміною біохімічних параметрів адаптивної відповіді організму риб на несприятливі дії умов середовища можна оцінювати ступінь його забруднення та небезпечності для біоти.

У зв'язку з цим метою наших досліджень стало виявлення загальних (універсальних) та специфічних відхилень в обміні речовин у риб на умов дії екстремальних факторів середовища для розробки критерію оцінки фізіолого-біохімічного стану та продуктивності ставкових риб (головню коропових) та антропогенного забруднення навколишнього середовища.

1. Методичні аспекти.

Дослідження виконано у лабораторії екологічної біохімії хіміко біологічного факультету Чернігівського педінституту ім. Г.Г. Шенчинця протягом 1990-1995 років на коропових рибах (кароп дусюватий, кароп рамний, білий амур, товстолобик звичайний) - основних представників промислового рибництва України. Вивчалася фізіолого-біохімічна реакція риб на дію екстремальних факторів середовища для оцінки їх життєдатності, процесів відтворення, росту та розвитку, а також розробки способів оцінки їх впливу на біопродукційні процеси. Крім того, за реакцією риб встановлювався критерій токсичності середовища і розроблялися тести біоіндикації забрудненню водойм рибогосподарського і рекреаційного призначення. Вивчалися можливості та способи корекції обміну речовин у риб з метою підвищення толерантності їх організму до екстремальних факторів середовища, у тому числі токсикантів.

На моменті обрано ті екстремальні фактори, які є лімітуючою у розвитку риб, та значною мірою обумовлюють погіршення

загального стану водних екосистем: низькотемпературне зимове та високотемпературне літнє голодування; аміаковий токсикоз, викликаний важкими металами (свинець, нікель, марганець, мідь) та їх сумішами з аміаком; стає експериментальної гіпоксії, аміну рН середовища (критичні низькі і високі значення рН) та комплексний політоксикоз, викликаний сумішами полідантів стічних вод очисних споруд промислових підприємств і міської водозбірної мережі. Ці фактори у даний час є яскраво вираженими стресовими чинниками у водоймах України у зв'язку з недосконалістю технологій вирощування ставкових риб, забрудненням водних екосистем важкими металами (надто свинцем у результаті заходів по ліквідації аварії на ЧАЕС), інтенсивною деградацією органічних речовин з виділенням значної кількості аміаку через загальне забруднення довкілля, недостатнім очищенням стічних вод тваринницьких комплексів та при культивуванні водних організмів у замкнених системах водопостачання.

На основі опрацьованої літератури виявлено і визначено ті ланки обміну речовин у риб, які визначають їх життєздатність, та чутливі до вказаних факторів.

II. Характеристика основних біохімічних порушень у риб за дії стрес- факторів зовнішнього середовища.

1. Особливості обміну білків, амінокислот та інших енергетичних субстратів організму риб у несприятливих умовах.

Дослідженнями встановлено, що дія стрес- факторів сприяє зниженню м'язової маси риб, змісту у них водорозчинної фракції білків, підвищенню обводненості м'язів, посиленню лізосомального протеолізу з участю катепсинаів, зниженню вільних амінокислот та підвищенню продукування аміаку.

Так, з жовтня по січень в м'язевій тканині цьогорічок кількість вільних амінокислот зменшується в 5 разів, при цьому отупівь використання серину, гліцину, аланіну, гістидину, лейцину та ізолейцину у 3-6 разів більша, ніж інших амінокислот. Витрачання загальних білків за цей період не відбувається. Одним, знайдено зменшення кількості білків, розчинних у воді та в 0,2 розчині хлориду натрію, кількість нерозчинних білків збільшується. Поясненням може правити інтенсивне використання ліпідів. Наприклад, протягом 4 місяців змівді вміст ліпідів в м'язовій риб зменшується в 2,5 рази.

Протягом всього періоду зимового голодування найбільші втрати загальних ліпідів спостерігаються у білих м'язах (87%) [1]. Щодо вуглеводів, то ми не спостерігали нагромадження глюкози і глікогену в тканинах молоді коропи в осінній період. Якщо жирові запаси з переходом риб на ендогенне живлення до середини зимівлі інтенсивно витрачалися і їх роль різко знижувалася у всіх досліджуваних тканинах, то вміст глікогену і глюкози до лютого, навпаки, збільшувався (для глюкози в м'язах до $35,6 \pm 7,3$, в печінці - до $132 \pm 11,7$, в мозку - до $31,5 \pm 2,6$ мг%). Стримані дані пояснюємо, виходячи з дослідження незворотніх реакцій глікогеногенезу. Збільшення активності цитоплазматичних Γ -6-фаз і Φ -1,6 Д-Фаз, що каталізують рівень глікогеногенезу в цілому, в печінці зимуючої молоді риб, свідчить про активацію цього процесу до середини зимівлі (лютий) [2]. В лютому після виснаження запасу вільних амінокислот енергетична мобілізація білків м'язів відбувається. Вміст загального білку в лютому нижчий в 2 рази, ніж в грудні, окремих фракцій білку теж менше в 2 рази, але, порівнявши з зимовим. Таким чином, в процесі зимового голодування молоді риби використовують певне значення в енергетичному метаболізмі відривати вільні амінокислоти і білки м'язової тканини. Наявність енергетичним субстратом на початкових стадіях голодування, домінує ендогенними ресурсами для життя організму у другій половині фізіологічного ритму голодування. Це дозволяє знизити вміст вільних амінокислот до голодування одним з факторів, що викликають усій зимівлі.

Враховуючи, якщо вміст амінокислот становить менше 15 мільонів в 1 грамі тканини м'яса, то відсоток загинелі риб доходить до 100%. Таким чином білок 15 мільонів на 1 грам тканини згідно проведених досліджень можна вважати критичним [3].

Важливу роль у риб визначає також черговість витрачання енергетичних субстратів. Наявність при достатньому вмісті названих субстратів у певний період для вірного прогнозування необхідних перемищених моментів перемищення метаболічних шляхів (наприклад, глікогену в м'язі). Такі точки є критичними для організму риби в цей період і забезпечення енергією за рахунок певних субстратів для зимівлі, а інші ще не вилучені до енергетичних субстратів в цей час і відносяться до забезпечення функціонування адаптаційних регуляторних механізмів. Такі перемищення в умовах зимівлі

Знайдена закономірність дозволила констатувати, що загальне накопичення ендогенних енергетичних субстратів (ліпідів, білків) ще не є гарантією успішної зимівлі, тому що навіть при їх достатній кількості дисбаланс в системі адаптивних реакцій може викликати загибель риб. Нами досліджені ці реакції, а також механізм резорбції запасних енергетичних субстратів та встановлені характеристики їх метаболіти і ферменти, за вмістом і активністю яких можна вірогідно оцінювати стан риб в умовах зимівлі. Найбільш значимими з них є: вільні амінокислоти, глюкоза, кетонів тіла, деякі кето- і оксикислоти, аденілатний енергетичний заряд, деякі ферменти гліколізу, циклу Кребса, глікогеногенезу. Для їх визначення використані методики, розроблені на основі загальноприйнятих з врахуванням об'єкту дослідження [4].

Названі критерії дозволяють в стислий термін доступними лабораторними методами оцінювати стан рибозаплідного матеріалу протягом всього періоду зимівлі, прогнозувати відсоток виходу молоді коропа і при необхідності змінювати гідрологічний і гідрохімічний режими для створення найсприятливіших умов. Використання цих критеріїв на Чернігівському рибокомбінаті дозволило збільшити вихід молоді риб з 68 до 85% [5].

2. Гомеостаз аміаку як показник стрес-реакції у риб.

Основним критерієм, який визначає фізіолого-біохімічну норму організму, є підтримання гомеостатичного рівня певних метаболітів, що займають центральне місце у регуляції обміну речовин, співвідношенні катаболічних та анаболічних процесів, формуванні фізіологічних реакцій організму. У прісноводних кісткових риб одним з таких інтермедіатів обміну речовин є аміак. Співвідношення швидкостей продукування, детоксикації та виведення останнього має вирішальне значення у забезпеченні їх життєдатності. При несприятливих умовах зовнішнього середовища, у тому числі за дії токсикантів різної природи, зміна аміакового гомеостазу в організмі риб є лімітуючим фактором визначення стійкості організмів в цих умовах [6].

Виявлено, що у коропа головним шляхом детоксикації і виведення аміаку є глутамінова система, суть функціонування якої полягає у його зв'язуванні у місцях утворення (печінка, м'язи, мозок та ін.) в нетоксичний глутамін в глутамінсукцинілатній реакції, транспорті останнього у ядра з наступним розщепленням глутамі-

назою і виведенням аміаку у зовнішнє середовище [7]. Додатковим шляхом детоксикації аміаку є аланіновий, суть якого полягає у амінуванні пірувату в аланінамінотрансферазній реакції у м'язах в аланін, транспорті останнього у печінку з наступним переамінуванням і утворенням пірувату, який використовується для біосинтезу глюкози шляхом глюконеогенезу.

У результаті проведених експериментів встановлено, що глутамінова система активно функціонує за всіх досліджуваних температур (7, 20 та 25°C).

Порівняння токсичності іонів важких металів і їх сумішей з аміаком показало, що в цілому присутність аміаку незначно впливає на модифікацію його метаболізму порівняно з дією іонів металів окремо. Однак в деяких випадках у сумішах проявляється взаємний вплив токсикантів. Відмічено інгібування переамінування за дії свинцю і аміаку на відміну від їх впливу окремо. Для дії нікелю характерні значніші відхилення абсолютних значень досліджуваних показників, ніж за впливу його суміші з аміаком. Аналіз даних дозволяє констатувати прояв синергізму для суміші свинцю з аміаком та антагонізму - для суміші нікелю з аміаком, що підтверджується вищим рівнем аміаку у мозку дослідних риб за дії суміші свинцю з аміаком порівняно з свинцем та зворотною залежністю для випадків нікель-нікель плюс аміак. Це може бути результатом рівного хімічного відношення даних металів до аміаку.

З результатів досліджень виходить, що токсичний та температурний вплив на метаболізм аміаку у коропа викликає активацію ферментних систем його детоксикації і виведення, порушення яких приводить до розвитку інтоксикації організму риб ендогенним аміаком. Оскільки зазначене явище характерне для всіх випадків токсичної дії, можливий єдиний підхід в оцінці впливу токсикантів на азотистий гомеостаз у риб.

Виявлена висока залежність обміну аміаку у мозку від ступеня збалансованості функціонування глутамінової системи в організмі коропа дозволила запропонувати показник для оцінки порушення азотового обміну в умовах токсичної дії. Проведений регресійний та кореляційний аналіз виявив високий ступінь кореляції між рівнем аміаку у мозку та відношенням активності глутамінін-тетази у м'язах і печінці та глутамінази у зябрах, особливо при 20 і 25°C [8].

Для всіх температур при досліджуваних типах інтоксикації

нами виявлено зворотню залежність між рівнем аміаку у мозку та показником відношення активностей глутамінсинтетази в м'язах та глутамінази у зябрах. Виявлено, що значення даного показника коливається від прояву токсичної дії в межах 4-12 при 7 та 25°C і 8-11 при 20°C. Для контрольних риб його значення становить 10 ± 1 при всіх досліджуваних температурах водного середовища. Вірогідне відхилення рівня аміаку в мозку від норми спостерігається при значеннях показника менше 6,0. Отже, зменшення показника відношення активності глутамінсинтетази в м'язах до активності глутамінази в зябрах вказує на недостатність інтенсивності зв'язування і виведення аміаку в організмі і його накопичення у мозку та розвиток стійкої інтоксикації організму [9]. Вказане співвідношення пропонуємо як тест-показник оцінки порушення фізіолого-біохімічного статусу організмів риб при вказаних типах токсикозів.

3. Енергетичний статус організму риб при стрес-дії.

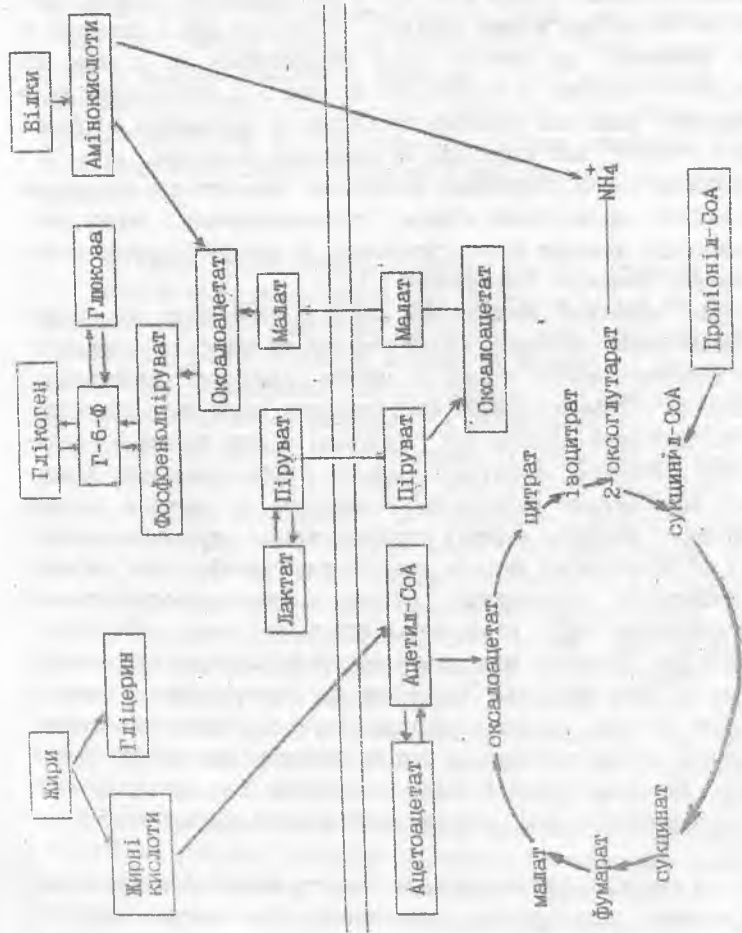
Зимове голодування можна розглядати не тільки як перехід на економне ендогенне живлення організму, але і як стан тривалого стресу, зв'язаний із зміною активності ферментів. Процес окиснювального фосфорилування, який забезпечує клітини макроергічними фосфорними сполуками, залежить від функційного стану гліколізу і трикарбонового циклу, про який можна судити як за активністю окремих ферментів, так і по зміні концентрації метаболітів [10]. Так, кількісне дослідження оксалоацетату, малату, пірувату і лактату показало, що в осінній період їх накопичення в білих м'язах, печінці та мозку щогорічок коропа не відбувається. У мовтні найменший зміст перерахованих метаболітів серед вказаних тканин спостерігається в білих м'язах (для оксалоацетату $0,15 \pm 0,01$; для лактату $0,18 \pm 0,03$ мкмоль на 1 г тканини; для пірувату $3,36 \pm 0,18$; для малату $1,65 \pm 0,05$ мкмоль в 100 г тканини); найбільше - в печінці. У лютому, коли температура води знижується до 0-2°C, має місце вірогідне зменшення рівня оксалоацетату в м'язах, пірувату і малату в м'язах і печінці. В той же час зміст лактату збільшився, тобто в тканинах відбувається активація гліколітичних процесів. Це підтверджується як зниженням окиснювальної здатності клітин м'язів і печінки, розрахованої по співвідношенню вільних НАД-пар, так і збільшенням лактатдегідрогеназової активності, особливо в печінці зимуючих риб.

Відомо, що життєдіяльність пойкилотермних організмів залежить від енергозабезпечення найважливіших органів риб, тобто від рівня макроенергетичних сполук, в першу чергу, АТР, а також від співвідношення аденилових нуклеотидів [11]. Протягом всього періоду зимівлі (листопад - квітень) в білих м'язах, печінці і мозку коропа відбуваються значні зміни вмісту аленосинфосфатів. Найбільше зменшення рівнів АТР, АДФ в досліджуваних органах відмічено в перші два місяці зимівлі. Кількість АМФ в тканинах в жовтні найменша, до лютого вона збільшується в м'язах до $0,60 \pm 0,02$; в печінці до $0,26 \pm 0,01$; в мозку - $0,20 \pm 0,01$ мікромоль в 1 г тканини. Далі цей показник практично не змінюється в білих м'язах і в мозку, але вірогідно збільшується в печінці.

Зниження рівня фосфатного потенціалу свідчить про зменшення енергоємності клітин білих м'язів, гепатопанкреасу, мозку риб. Всі перелічені фактори можуть призвести до загибелі молоді коропа в процесі зимового голодування [12].

Однак, проведені дослідження доводять припущення про існування адаптивних перебудов обміну речовин та енергії, спрямованих на виживання молоді коропа в умовах зимового голодування. Узагальнення отриманих результатів дозволяє припустити про існування особливостей метаболізму у зимуючій молоді коропа та спрямованість адаптивних механізмів (мак.1), котрі полягають у наступному: забезпеченні субстратами тканин риб в зимовий період для успішного перебігу реакцій глікоконезису; утворення кетонів тїл як додаткового джерела енергії для периферійних тканин [13]; можливість детоксикації аміаку в мозку, опосередковану 2-оксоглутаратом [14]; міокіназним шляхом ресинтезу АТР [12]. Регуляція цих процесів може стати фактором підвищення толерантності риб до умов зимівлі. Вирішення цих задач можливе шляхом збагачення штучних кормів вітамінами групи В, мікроелементами, збільшенням частки протеїну та шляхом розвитку природної кормової бази для накопичення біохімічно важливих для цьогорічок коропа вільних амінокислот, білків, стабілізації енергетичного обміну [3].

Окрім зимового голодування, на енергозабезпечення організму коропа впливає політоксикоз, викликаний дією стічних вод. За вказаної ситуації у риб встановлено вірогідне зниження вмісту АТР в усіх досліджуваних тканинах (м'язевий, печінки та мозку).



Мал. 1. Загальна схема особливостей метаболізму енергетичних компонентів у зимуванні молоді коропа.

В той же час динаміка вмісту АМР - протилежна. Щодо АДР, то тільки в м'язевій тканині його вміст в контрольних риб вищий. Величина аденілатного енергетичного заряду, відношення мас аденілаткіназної реакції, відношення АТР до АДФ, енергетичний фосфатний потенціал показують значно вищий енергетичний статус у контрольної групи риб. При цьому, дані відмінності яскраво видно у білих м'язах та печінці, і практично не спостерігаються в мозку. Стабільність мозку за токсичної дії стічних вод може бути пояснена як високим рівнем толерантності нервової системи гідробіотів, так і можливістю функціонування адаптивних механізмів підтримання енергетичного гомеостазу. Щодо останнього, то встановлено накопичення кетонних тіл (ацетоацетату, ацетону та 3-оксобутирату) в тканині мозку дослідних тварин [15].

Враховуючи одержані нами дані про інтенсивне використання кетонних тіл як додаткового джерела енергії для мозку риб при недостатньому забезпеченні організму глюкозою в умовах гіпотермії та голодування, припускаємо, що кетонні тіла є адаптивним енергетичним субстратом для нервової тканини за дії абіотичних факторів в цілому [14].

4. Особливості нейро-гуморальної відповіді ЦНС на дію стрес-факторів.

Екстремальні умови зимиwдлі призводять до розвитку в мозку риб стійкого аміачкового токсикозу, який характеризується підвищенням рівню аміаку до 3-6 ммоль в 1 г тканини проти норми (0,7-1,0 ммоль/г). Аналіз отриманих даних підтверджує значну роль глутамінової гілки його детоксикації. При цьому утворення глутамату може мати і нейромедіаторне значення. Синтез глутаміну із глутамату та його розпад, вірогідно, здійснюється з метою регуляції гомеостатичного функційно необхідного рівня глутамату в мозку.

В зв'язку з виявленими закономірностями досліджено можливість регуляції функціонування глутамат-глутамінової системи катіонами деяких металів (Mn²⁺, Mg²⁺, Co²⁺) шляхом внесення їх солей у водне середовище. З отриманих даних випливає, що Mn²⁺ не змінював вміст аміаку, глутаміну, глутамату і активності глутамінази. Активність глутамінсинтетази вірогідно збільшилася, що може бути причиною витримування гомеостатичного рівню аміаку. Це співпадає з отриманими нами раніше даними про активацію іонами

Mg^{2+} глутамінсинтетази в м'язах та печінці коропа [17].

Аналогічний вплив на вміст аміаку мали іони Mg^{2+} , однак, механізм його дії, ймовірно, інший. Вірогідно, в даному випадку має місце активація NADP - залежної аміак-зв'язуючої глутаматдегідрогенази. Підтвердженням цього є вірогідне збільшення вмісту глутамату. Практично той же ефект спостерігаємо при вивченні впливу іонів Co^{2+} . Таким чином, досліджені іони адійснюють певний протекторний вплив в умовах аміакового токсикозу, сприяючи підтриманню гомеостатичного рівню аміаку.

Із отриманих даних випливає, що в умовах інтоксикації в період зимівлі та за ендогенного аміакового токсикозу показники глутамінової системи також змінюються певним чином, однак ці зміни менш істотні, ніж в інших тканинах. В зв'язку з цим припускаємо можливість меншого використання в мозку інтермедіатів глутамат-глутамінової системи в зв'язуванні аміаку. Це може мати місце в зв'язку з тим, що глутамін, глутамат, а також їх попередник 2-оксоглутарат в мозку відіграють провідну роль в забезпеченні енергетичних функцій, а глутамат, крім цього, є нейромедіатором. Детоксикація аміаку, вірогідно, адійснюється іншим шляхом, наприклад, аламінівом.

Регуляція концентрації нейромедіаторів, глутамату та аміаку в мозку риб поряд з глутамат-глутаміновою системою адійснює ГАМК і гама-амінобутиратний шунт. Крім цього, важливим нейромедіатором мозку є ацетилхолін, який синтезується за допомогою ацетилхолінтрансферази. Таким чином, від активності ацетилхолінтрансферази і ацетилхолінстерази (АХЕ) залежить динаміка вмісту ацетилхоліну у нервовій системі, а в зв'язку з цим і регуляторний вплив нервової системи на різні органи. Найвищий рівень активності АХЕ в мозку риб знайдено в грудні. АХЕ, руйнуючи ацетилхолін, попереджує передачу нервового збудження і посилення обміну речовин. Крім цього, в грудні виявлено високу активність глутаматдекарбоксілази, результатом дії якої є утворення іншого нейромедіатора - ГАМК, який також володіє гальмівною дією. Ці дані показують, що функціонування гама-амінобутиратного шунту в зимові місяці має значення в формуванні нейромедіаторного статусу ЦНС риб.

У квітні активність АХЕ нижча, ніж в грудні, але достатньо висока, щоб сприяти збереженню енергетичного гомеостазу риб.

Таким чином, співвідношення вмісту субстратів гама-амінобу-

тиратного шунту та їх ферментних перетворень співпадає з фізіолого-біохімічною динамікою обміну речовин у риб протягом річного циклу. Встановлені закономірності підтверджують адаптивну реакцію і функціонування гілок гама-амінобутиратного шунту у залежності від потреб організму і є компенсаторно-захисною відповіддю на дію несприятливих факторів зовнішнього середовища і сезонні коливання температури і живлення, дії токсикантів та ін. Припускаємо, що максимальний прояв вказаних факторів призводить до дисбалансу перебігу досліджених реакцій, порушення нейрофізіологічних функцій і загибелі риб. Тому виявлена нами можливість їх кор-екції іонами деяких металів, які широко використовуються у рибництві, є перспективним методом керування фізіолого-біохімічним станом риб за умов стресу. Потенційними для практичного застосування в цих цілях є іони Mg^{2+} .

5. Стан гемоглобінової системи риб в несприятливих умовах середовища.

Відомо, що дія токсичних речовин викликає в організмі тварин зміну складу, структури та функційних характеристик білків крові [18], в першу чергу, гемоглобіну [19]. Тому аміна його властивостей успішно використовується для тестування патологічних станів у ссавців [20]. Гематологічний аналіз одержав розвиток як метод екологічної біоіндикації, який використовується для оперативної оцінки ступеня забруднення водойм за характеристиками крові риб як акумуляторів різноманітних токсикантів. Такий підхід дає можливість виявити небезпечні рівні токсичних речовин в воді по відхиленню параметрів гемоглобінової системи від норми задовго до появи стійких клінічних ознак інтоксикації гідробіонтів.

В зв'язку з цим нами проведено дослідження деяких біохімічних реакцій гемоглобіну коропових риб на дію екстремальних факторів середовища. Вивчено вміст форм гемоглобіну (дезоксид-, оксид- та метгемоглобіну), кінетика лужної та кислотної денатурації гемоглобіну, а також дезоксигенації оксигемоглобіну при дії аміаку окремо та в комплексі з іонами металів - Mg^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , зміни рН води, а також гіпоксії.

Встановлено, що вміст форм гемоглобіну залежить від типу інтоксикації. У випадку аміакового токсикозу спостерігається різке зменшення вмісту дезоксиформи у жовті в 3 рази, у грудні

- в 2 рази, у лютому - в 3 рази. Крім того, різко зменшується рівень дезоксигемоглобіну у риб, які витримуються в середовищі аміаку з додатковим токсикантом. У випадку дії суміші аміаку і іонів магнію вміст дезоксиформи зменшується в 4 рази, а у випадку спільного впливу аміаку і гіпоксії - в 5 разів. Найбільший вплив на рівень оксигемоглобіну здійснює зміна рН середовища ($6,4 \pm 0,1$ та $8,1 \pm 0,1$). При цьому концентрація оксиформи у дослідних риб зменшується в 2,5 та 4,5 рази відповідно. Передбачаємо, що коливання кислотності середовища здатне змінювати спорідненість гемоглобіну до кисню. Це узгоджується з даними про те, що підкислення середовища знижує спорідненість гемоглобіну до кисню (ефект Бора) за рахунок аміни заряду молекул гемоглобіну. Збільшення рН середовища до 8,1, на нашу думку, може активувати гліколіз, за рахунок інтенсивності якого, в свою чергу, може знижуватися спорідненість гемоглобіну до кисню.

В умовах зимівлі характерне зменшення вмісту метгемоглобіну з 20 мкмоль/мл у жовтні до 2,23 й 1,52 мкмоль/мл у грудні та лютому відповідно, а також значне збільшення рівня оксигемоглобіну у лютому порівняно з груднем (37,5 та 10,3 мкмоль/мл відповідно). Зниження вмісту метгемоглобіну може бути адаптивною реакцією організму риб на ті стресові умови, які викликані низькими температурами, недостатністю кисню у воді та голодуванням риб у зимовий період. В той же час збільшення рівня оксиформи гемоглобіну може бути пов'язано з тим, що в цей період енергетичне забезпечення організму риб в основному відбувається за рахунок гліколізу.

Іншим показником гемоглобінової системи риб є здатність до дисоціації оксигемоглобіну. Максимальні значення цього показника виявлено в жовтні, мінімальне - в червні. Еважуємо, що в жовтні це пов'язано з низькою стійкістю оксигемоглобіну при підготовці риб до зимівлі. Найяскравіший прояв киснезв'язуючої функції в червні пов'язуємо з активним ростом риб.

Ці дані узгоджуються з кінетикою дезоксигенації оксигемоглобіну. В жовтні цей показник максимальний, у червні - мінімальний. Це може бути пов'язано також з тим, що у жовтні рівень вуглекислого газу у воді більший, ніж у червні, а це, в свою чергу, зменшує спорідненість гемоглобіну до кисню (ефект Руга). При всіх типах токсичних впливів та їх комбінацій швидкість дисоціації оксигемоглобіну знижується.

Криві лужної денатурації гемоглобіну риб, які зазнали дії екстремальних факторів середовища, невзначно відрізнялись від контрольних. В той же час криві кислотної денатурації гемоглобіну дослідних риб свідчать про збільшення його чутливості до даного хімічного реагенту. Подібні висновки можна зробити, розглядаючи сезонні зміни лужної та кислотної денатурації гемоглобіну. Криві лужної денатурації гемоглобіну риб в різні періоди року невзначно відрізнялись одна від одної. При аналізі кислотної денатурації можна спостерігати зміну чутливості гемоглобіну до денатуруючого фактору: у жовтні адатність гемоглобіну до денатурації найбільша, а у квітні - найменша. Зважаємо, що це пов'язано з більшою стійкістю гемоглобіну до кислотної денатурації у квітні і значно меншою у жовтні.

На основі отриманих даних, враховуючи доступність методів, які використовувалися, досліджені показники можуть бути рекомендовані для біоіндикації інтоксикації у риб, а також оцінки їх фізіологічного стану і розвитку як у природних умовах, так і при штучному вирощуванні.

6. Вплив факторів середовища на процеси перекисного окиснення ліпідів.

З системою киснезабезпечення риб тісно пов'язані процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Оскільки система киснезабезпечення риб є чутливою до різноманітних несприятливих факторів середовища, то порушення в гемоглобіновій системі викликають відхилення в процес-ах ПОЛ, наприклад, висока концентрація метгемоглобіну ініціює перекисні процеси [21]. Останні полягають в модифікації за участю активних форм кисню валичків ненасичених жирних кислот мембранних ліпідів. При цьому для організму є токсичними не тільки проміжні (гідроперекиси, дієнові кон'югати, вільні радикали), але й кінцеві (малоновий диальдегід) продукти цього процесу [22]. Підвищення вмісту продуктів ПОЛ розглядається як патологія і є одним з критеріїв оцінки токсичності речовин для тварин, в тому числі риб [23].

Нами встановлено, що для карпових риб характерна сезонна динаміка вмісту малонового диальдегіду в м'язах, аябрах, печінці та крові з максимумом у жовтні. Такі зміни пов'язані з початком зимівлі риб, вхід в яку спряжений для них з виникненням фізіологічно-біохімічного стресу, викликаного низькою температурою та пе-

реходом на ендогенне живлення, а також з необхідністю адаптивної модифікації мембран в загальному адаптаційному процесі. Зябри, печінка і, особливо, кров є бар'єрними відносно ПОЛ і добре забезпечені антиокиснювальними клітинними системами [24].

За токсичної дії аміаку спостерігається збільшення вмісту продуктів ПОЛ в печінці ($0,172 \pm 0,073$ проти контролю $0,112 \pm 0,021$ мікромоль малонового діальдегіду на 1 мг білку) та в крові ($0,098 \pm 0,011$ у досліджуваних риб проти $0,076 \pm 0,009$ у контрольних). Ці органи є бар'єрними щодо "перекисової небезпеки". Вони захищають м'язи та зябри від дії токсичних перекисних продуктів. Встановлено, що за умов аміакової інтоксикації у коропових риб функціонує переважно аскорбат-залежна система ПОЛ і тому корегування перекисних процесів ускладнюється. За умов дії аміаку в суміші з іонами важких металів (Pb^{2+} , Ni^{2+}) та іонів важких металів окремо вміст малонового діальдегіду збільшується в 2 рази в крові, печінці, зябрах, а також порушується кінетика нагромадження малонового діальдегіду. Одночасово з цим зменшується антиокиснювальна активність вказаних тканин та активність ферментів антиокиснювального захисту - супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази. Одержані дані вказують на високу токсичність важких металів для коропових риб.

Висновки.

Таким чином, комплекс біохімічних досліджень дав можливість встановити специфічні критерії оцінки несприятливого абіотичного та токсичного впливу на риб низки факторів, які рекомендовані відповідним службам державного контролю та народно-господарським організаціям для практичного застосування (таблиця).

Результати робіт впроваджуються у господарствах Мінрибгоспу України, у розробках Інституту рибного господарства УААН як критерії екологічної індикації водного середовища. У даний час критерії оцінки стану коропових риб в умовах зимівлі застосовано у практиці роботи Чернігівського обласного виробничого комбінату рибництва, що дало можливість підвищити вихід молоді риб із зимівлі з 68 до 85%.

За результатами робіт розроблено низку методів оцінки стану коропових риб за стрес-дії, які опубліковано у вигляді рекламно-інформаційних повідомлень і надіслано у рибні господарства та лабораторії Державного екологічного контролю та санітарного нагляду України для апробації та реалізації у практичній діяльності

Таблиця I. Критерії оцінки стрес-дії та токсичності середовища для риб.

Тип стрес-дії, вид токсичності	досліджуваний показник	ступінь вираження, який відповідає критичному стану риб
Голодування, вплив низьких температур	рівень амінокислот у м'язах	менше 15 мікромоль на 1 г тканини
Голодування, вплив низьких температур, інтоксикація важкими металами	кетонів тіла (ацетоацетат, бета-гідроксипутират, ацетон)	наявність у тканинах (печінка, мозок) більше 6 мікромоль на 1 г
Ті ж, а також аміаковий токсикоз	рівень аміаку у мозку відношення активності глутамінсинтетази до активності глутамінази (м'язи:язра)	більше 0,6 мікромоль на 1 г тканини значення коефіцієнту менше 10±1
	синтез другої форми глутамінсинтетази у м'язях та печінці	наявність смуги ізоферменту при електрофорезі гомогенатів тканин у ПААГ
	гліцого-аланіновий цикл	активація ферментів
Дія важких металів	вміст метгемоглобіну криві дисоціації оксигемоглобіну криві лужної денатурації гемоглобіну	підвищення до 50-60% зміщення вправо зміщення вниз
Дія важких металів	рівень продуктів ПОЛ (малоновий диальдегід, дієнові кон'югати) у крові	підвищення у 2 рази проти контрольних показників: 0,4±0,05 мікромоль в 1 мл
Ті ж, голодування, аміаковий токсикоз	стан гама-амінобутиратного шунту мозку	підвищення активності

(Новые критерии прогнозирования зимовки молоди карпа. - Жиденко А.А., Грубинко В.В. - Чернигов: ЦНТИ. - 1993. - 4 с.; Новые методы биотестирования аммиачного загрязнения водоемов. - Грубинко В.В., Жиденко А.А. - Чернигов: ЦНТИ. - 1993. - 4 с.). Розроблено і заявлено до патентної служби України винахід "Спосіб оцінки токсичного забруднення водного середовища аміаком" (Грубинко В.В., Коновець І.М., Арсан О.М. та ін. - Заявка на авт. свід. N444401175. Пов. рішення від 05.04.1994 р. - 4 с.), Даний винахід є пріоритетною розробкою методу біоіндикації водного середовища на забруднення аміаком і дасть можливість внесення біотесту у реєстр методів токсикологічного моніторингу водойм на аміак, який у даний час не проводиться.

ЛІТЕРАТУРА

1. Жиденко А.А., Коновець І.Н., Явоненко А.Ф. Динамика использования энергетических субстратов в тканях зимующей молоди карпа // VIII научная конф. по экол. физиол. и биох. рыб.: Тез. докл., Петрозаводск: Кар. н.у.РАН. - 1992. - Т.1. - С. 102.
2. Явоненко О.Ф., Грубинко В.В., Жиденко А.О. Динамика углеводов в тканях молоди карпа в процесі зимівлі //Рибне господарство. - 1993. - В.47. - С. 18-21.
3. Жиденко А.А. Особенности метаболизма энергетических компонентов у зимующей молоди карпа и роль адаптивных механизмов в ее выживаемости //Автореф. дис...к.б.н. - Киев, 1990. - 18 с.
4. Жиденко А.А., Явоненко А.Ф. Адаптивное сохранение энергетического гомеостаза у зимующей молоди карпа // Механизмы адаптации животи. и раст. к экстр. факторам среды: Тез. 6-й Респ. н/п шк.-сем.- сент. 1990. - Ростов-на-Дону. - Т.2. - С. 183-184.
5. Жиденко А.А., Грубинко В.В. Новые критерии прогнозирования зимовки молоди карпа //Черниговский МПЦНТИ, 1993. - Информ. лист. N 16-93, - 4 с.
6. Лукьяненко В.И. Общая ихтиотоксикология. -М.:Легк. и пищ. пром. -сть, 1983. -220 с.
7. Грубинко В.В. Роль глутамина в обеспечении азотистого гомеостаза у рыб /обзор//Гидробиол. журн.-1991.-4,27.- С. 46-56.
8. Коновець І.Н., Грубинко В.В., Арсан О.М., Кулик В.А. Функционирование адаптивных систем детоксикации аммиака у карпа под воздействием температуры//Гидробиол. журн.- 1993.- 29, 5.-С. 47-52.

9. Коновец И.Н., Кулик В.А., Арсан О.М. и др. Влияние свинца на метаболизм аммиака у карпа при различных температурах водной среды//Гидробиол. журн.- 1994.-30, 5.-С. 79-84.
10. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация.- М.: Мир, 1988.- 568 с.
11. Малиревская А.Я., Вильк Т.И., Шерстюк В.В. и др. Сезонная динамика макроэнергических соединений в мышцах рыб//Гидробиол. журн. - 1985.-21, 4.-С. 55-63.
12. Жиденко А.А., Яковенко В.В., Явоненко А.Ф. Состояние энергогенерирующей системы в тканях у зимующей молоди карпа //Гидробиол. журнал.- 1990.-61.-В 90 Деп.- 26 с.
13. Жиденко А.А., Грубинко В.В., Явоненко А.Ф. Роль кетонových тел в энергообеспечении пойкилотермных организмов в условиях зимнего голодания//Укр. биохим. журн.-1990.-62, 5.-С. 72-76.
14. Жиденко А.А., Грубинко В.В., Явоненко А.Ф. Особенности взаимопревращения α -кетоглутарат-глутамат в митохондриях мозга экзотермных животных в условиях зимовки//Укр. биохим. журн.- 1990.-62, 6.-С. 79-83.
15. Жиденко А.О., Грубинко В.В., Явоненко О.Ф. Энергозабезпечення організму коропа при політоксикові, викликаному стічними водами//VI Укр. біох. з'їзд: Тез. доп., Київ, травень 1992р. -Київ:Вид-во УСТА.- 1992.-Ч.2.-С. 31.
16. Жиденко А.А., Грубинко В.В., Смольский А.С., Явоненко А.Ф. Влияние абиотических факторов водной среды на образование кетонových тел у рыб//Гидробиол. журн.-1994.-30, 2.-С. 87-92.
17. Грубинко В.В., Коновець І.М., Явоненко О.Ф. Особливості взаємодії аміаку з глутамінсинтетазою риб in vivo//VI Укр. біохім. з'їзд, Київ, червень 1992 р.: Тез. доп.-Київ: УСТА, 1992.-Ч. II- С. 21.
18. Троицкий Г.В. Патологическая анатомия белков.- Симферополь: Таврия, 1983.-320 с.
19. Семенчева Д.М. Типы гемоглобинов в норме и при воздействии на организм некоторых химических веществ: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук.- Киев, 1972.-54 с.
20. Стародуб Н.Ф. Методы исследования структурной гетерогенности гемоглобинов млекопитающих/Методы молекулярной биологии.-К.: Наукова думка, 1979,-С. 176-191.
21. Горбенко Г.П. Індуковане метгемоглобіном перекисне окиснення ліпідів у модельових мембранах//Укр. біохім. журн.- 1992. -

64, 4.С. 108-112.

22. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. -М.:Наука, 1972.-257 с.
23. Яблоков А.В., Остоумов С.А. Уровни охраны живой природы. - М.: Наука, 1985.-175 с.
24. Чернышов В.И. Этиология и профилактика свободнорадикальной патологии при физиологической адаптации рыб к условиям, не свойственным экологии вида/Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. -М.:Наука, 1982.-С. 141-150.

ПЕРЕТВОРЕННЯ ГЛЮКСИЛАТУ В ОРГАНІЗМІ КОРОПА

Яковенко В.В., Коваль В.О., Явоненко О.Ф.

На основі досліджень, що проведені в останні роки на різних видах риби, встановлено, що пул вільних амінокислот в білих м'язях цих пойкилотермних тварин відрізняється великою варіабельністю не тільки у порівнянні з теплокровними тваринами, але й між собою. В м'язах окремих видів риби в значній кількості присутні таурин, серкозин, β -аланін. М'язи інших видів багаті на гліцин, α -аланін і та глутамін [5]. Відомі види, в яких переважає пролін [3], лейцин [2].

Рівномірний пул вільних амінокислот і в м'язах морських видів. В одних переважає гістидин, α -аланін і гліцин [4], в інших - тільки гістидин [30]. Але у більшості випадків домінує гліцин [9,16,17,20].

Домінуючою амінокислотою білих м'язів мешканця наших внутрішніх водоймищ, коропа лускатого, так як і у більшості інших прісноводних і морських риби, є гліцин [5,6].

Нашими дослідженнями встановлено, що гліцин в організмі коропа досить легко перетворюється шляхом окислювального дезамінування з участю власне гліцинооксидази, а також дезамінуючими НАД⁺ і НАДФ⁺ - залежними дегідрогеназами в гліоксилову кислоту [7,8]. Остання, являючись альдегідокислотою, є надалі реактивне речовина і має багато різних шляхів подальшого перетворення. Зокрема, в клітинах *E. coli* з участю малатсинтетази гліоксилат з ацетилфосфатом утворює малат [10]. У *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.*, *Pseudomonas fluorescens* [14,31] гліоксилова кислота за допомогою ізоцитратази конденсується в сукцинатом, і таким чином, дає початок утворенню трикарбонових кислот. Гліоксилат конденсується також з кетокислотами. Так, в пе-

чінці шурів виявлено фермент КОГ-альдозаза, що каталізує реакцію конденсації гліюксилату з піруватом [23]. У *Aspergillus niger* та *Rhodospseudomonas spher.* виявлено фермент, а участю якого гліюксилат конденсується з α -кетоглутаратом [[18,27]. Реакцію конденсації гліюксилату з оксалоацетатом виявлено в печінці шурів [15], препаратах кори винок морських свинок, печінці та м'язах голуба [1].

Гліюксилова кислота може не тільки утворюватись з гліцину, але й ферментативно конденсуватись з ним. При цьому утворюється β -оксинаспарагінова кислота [25]. Гліюксилат конденсується з такими ацил-КоА, як пропіоніл-КоА [1], бутирил-КоА [28,29], валеріал-КоА [21]. Заслужовує на увагу виявлене у мікроорганізмів перетворення гліюксилової кислоти за допомогою залежної від тіамініпрофосфату гліюксилатної карболігази [11,13,19,22,24]. Продуктом такого ферментативного перетворення є спочатку семиальдегід тартронової кислоти (або його ізомер оксипіруват), а потім гліцерат. Для організму риби наявність такого ферменту мало б величезне значення, оскільки утворений гліцерат при наявності АТФ з гліцераткіназної реакції може перетворюватись в 3-фосфогліцерат, а потім у 2-фосфогліцерат. Ці фосфогліцерати є попередниками вуглеводів. Тому гліюксилаткарболігазне перетворення гліюксилової кислоти дає можливість організму коропових риби синтезувати глюкозу з одного лише гліюксилату, а фактично з гліцину. Це особливо важливо для риби в ті періоди, коли в природніх умовах зимового голодування вуглеводи у водоймищах відсутні, а в м'язах коропа міститься значна кількість вільного гліцину.

У зв'язку з цим, було проведено дослідження по виявленню гліюксилаткарболігази - ферменту, а допомогою якого відбувається одне з можливих перетворень гліюксилової кислоти в організмі коропа. Подібне перетворення гліюксилату виявлено головним чином у мікроорганізмів, грибів, печінки голуба та шурів. Що стосується риби, у тому числі і коропа, то даних по цьому питанню в літературі не знайдено.

Для дослідження даного питання були використані частково діалізовані екстракти гепатопанкреасу та білих м'язів коропа. Інкубаційна суміш мала такий склад: K^+ - фосфатний буфер - 43 мкмоль; хлорид магнію - 5 мкмоль; ТДФ - 4 мкмоль; гліюксилат натрію - 10 мкмоль. ферментний препарат - в кількості 6.0 мг білку. Реакцію розпочинали додаванням 0,36 мкмоль $NaDN \cdot H^+$ і протя-