ОРДЕНА ЛЕНИНА И ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ
АКАДЕМИЯ НАУК УССР
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.В.ПАЛЛАДИНА

На правах рукописи

ЖИДЕНКО
Алла Александровна

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ У ЗИМУЮЩЕЙ МОЛОДИ КАРПА И РОЛЬ АДАПТИВНЫХ МЕХАНИЗМОВ В ЕЕ ВЫЖИВАЕМОСТИ

03.00.04 - биохимия

А в т о р е ф е р а т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

КИЕВ - 1990

Работа выполнена в Черниговском государственном педагогическом институте имени Т.Г.Шевченко

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор ЯВОНЕНКО А.Ф.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор КУРСКИЙ М.Д, доктор биологических наук, старш.научн.сотр.СОЛОМАТИНА В.Д.

Ведущая организация: Киевский государственный университет им.Т.Г.Шевченко

Защита состоится "6" декабря 1990г. в 14.30 на заседании специализированного совета К 016.07.01 в Институте биохимии им.А.В.Палладина АН УССР /252030 Киев-30, ул. Леонтовича, 9/.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биохимии им.А.В.Палладина АН УССР

Автореферат разослан "1" ноября 1990г.

Ученый секретарь специализированного совета О.В.Кирсенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одним из направлений интенсификации прудового рыбоводства является получение достаточного количества качественного рыбопосадочного материала. Нормативный выход молоди карпа из зимовки составляет 80–85% в рыбоводческих хозяйствах зоны умеренного климата европейской части СССР. Однако в производственных условиях он ниже: в отдельных случаях достигает только 20% /Козлов,1980/. Первоначально было показано, что выживаемость сеголеток во многом определяется уровнем их упитанности в начале голодания /Себенцов и соавт.,1940;Поляков,1964/, в частности, содержанием общего протеина, жира, влаги /Щербина,1976/. По данным веществам установлены количественные показатели химического состава тела сеголеток в осенний период /Карзинкин,1952; Мухина,1973;Канаев,1976/. Однако общие показатели упитанности рыб часто не отображают объективного состояния зимующей молоди и приводят к ошибочным результатам при прогнозировании зимовки. В более поздних исследованиях, причиной гибели рыб, кроме неблагоприятных условий зимовки и истощения рыб в результате голодания, предложено считать нарушение гомеостаза внутренней среды организма под воздействием низких температур /Остроумова и соавт.,1979/. Выдвинуто предположение, что физиологическую подготовленность рыб к зимовке определяет группа веществ, наиболее метаболически активных в этот период, обеспечивающих достаточный для поддержания гомеостаза уровень обмена, способствующий выживаемости рыб. Предполагается, что одним из возможных биохимических отклонений, вызывающих данные нарушения и ведущих к гибели рыб, могут быть изменения фосфолипидного состава мембран клеток различных органов /Сидоров и соавт.,1985;Лизенко и соавт.,1985/. Принято считать, что под воздействием голодания во время зимовки в тканях молоди карпа происходят функциональные нарушения, причиной которых также является комплекс абиотических и биотических факторов, среди которых первостепенным следует считать совместное воздействие на организм неблагоприятных условий и недостаточность энергообеспеченности обменных процессов при дефиците запасного эндогенного материала. Однако в доступной нам литературе, мы не обнаружили сведений о нарушениях обмена в организме зимующих сеголеток карпа. Кроме того невыяснены моле-

кулярные принципы адаптации к неблагоприятным условиям зимнего голодания, не установлены возможные компенсаторные механизмы сохранения энергетического гомеостаза, как важнейшего условия для поддержания жизненных функций организма рыб в этот период.

Цель и задачи исследования. Работа посвящена изучению особенностей обмена отдельных веществ и энергии у зимующей молоди карпа и исследованию адаптивных механизмов энергетического гомеостаза организма рыб.

Объект исследования - основной представитель промышленных прудовых рыб - карп (Cyprinus carpio L.).

В число основных задач работы входило:

- изучение содержания запасных энергетических компонентов /липидов, белков и углеводов/ в тканях молоди карпа в процессе зимовки и возможность образования глюкозы с помощью реакций глюконеогенеза;

- установление уровней активности лактатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и содержания субстратов этих реакций /лактата, пирувата, малата, оксалоацетата/;

- изучение динамики содержания макроэргических соединений в тканях молоди рыб в течение зимовки;

- исследование некоторых адаптивных механизмов поддержания энергетического гомеостаза в организме карпа в период зимовки.

Научная новизна работы. Впервые установлена зависимость между содержанием свободных аминокислот в мышцах молоди карпа и показателем выхода рыб из зимовки /% выхода/; предложен новый критерий возможности прогнозирования протекания зимовки карпа - количество свободных аминокислот в мышечной ткани сеголеток осенью. Найдены различия в механизмах энергообеспечения в тканях мозга, печени и белых мышц молоди карпа в процессе и по выходу рыб из зимовки. Показано адаптивное сохранение энергетического гомеостаза у зимующей молоди карпа. Установлены особенности взаимопревращения 2-оксоглутарат-глутамат в митохондриях мозга исследуемых организмов, направленные на детоксикацию избыточного аммиака в данный период.

На основании полученных данных выдвинуто предположение о ведущей роли фактора энергообеспечения организма рыб в их выживаемости.

Практическая ценность работы. Результаты настоящей работы мо-

гут быть использованы для оценки выживаемости зимующей молоди карпа и прогнозирования течения ее зимовки. Предложен критерий, определяющий физиолого-биохимическую подготовленность входящих на зимовку сеголеток. Полученные в естественных условиях результаты являются основанием для выяснения причин гибели прудовых рыб и могут служить предпосылкой по оптимизации проведения зимовки молоди карпа.

Апробация работы. Основные положения доложены на:

1. У-м Всесоюзном биохимическом съезде /Киев, 1986/.
2. У-м Украинском биохимическом съезде /Ивано-Франковск, 1987/.
3. 1-м Всесоюзном симпозиуме по экологической биохимии рыб /Ярославль, 1987/.
4. Всесоюзном совещании "Экологическая энергетика животных" /Суздаль, 1988/.
5. У11 Всесоюзной конференции "Экологическая физиология и биохимия рыб"/Ярославль, 1989/.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы /1 глава/, экспериментальной части /4 главы/, заключения и выводов. Работа изложена на 166 страницах машинописного текста, содержит 20 рисунков, 15 таблиц, 261 литературный источник, в том числе 117 иностранных.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использовали особей карпа (Cyprinus carpio L.) возрастом до года, массой 20-60г. Ежемесячно или трижды /в начале, середине и по окончанию зимовки/ отбирали по 20-30 экземпляров из зимовального пруда №2 Черниговского рыбопитомника. В апреле были выделены две группы рыб: к первой /сильные/ отнесены активные, подвижные особи, быстро реагирущие на внешнее раздражение. Ко второй группе /слабые/ - неактивные, вялые, малоподвижные особи с замедленной реакцией на раздражение /Сидоров и соавт., 1985; Лизенко и соавт., 1985/. Изучение изменений содержания эндогенных питательных субстратов проводили следующими методами: содержание свободных аминокислот определяли методом бумажной хроматографии /Пасхина, 1964; Починок, 1976/; содержание белка и его фракций - методом Кьельдаля после фракционирования /Яковенко и соавт., 1982/; содержание суммарных липи-

дов определяли с использованием стандартных наборов реактивов фирмы "Chemapol" /ЧССР/; содержание гликогена - по Зефтеру фотометрическим методом по интенсивности цветной реакции гидролизованного гликогена с о-толуидиновым реактивом /Асатиани, 1957/; глюкозу - также с помощью о-толуидинового реактива; кетоновые тела методом, описанном в работе /Баев,1973/в некоторой модификации. Определение лактата, малата, оксалоацетата, пирувата осуществляли ферментативными методами /Bergmeyer , 1963;Прохорова и соавт.,1982/в безбелковом тканевом экстракте, который готовили /Bergmeyer,1963; Faupol ,1972/на 6% хлорной кислоте, при охлаждении жидким азотом.Кроме того оксалоацетат и пируват определяли методом тонкослойной хроматографии на "Silufol" UV -254 /ЧССР/ по Лисняк /1981/. Для определения изменений содержания аденилатов при приготовлении безбелкового экстракта использовали 8% хлорную кислоту и далее по методике Маляревской и соавт./1985/.При исследовании состояния энергогенерирующей системы в тканях рыб были изучены уровни некоторых ферментативных активностей:аденилаткиназная - по методике Окунцова /1988/;сукцинатдегидрогеназная - по Прохоровой и соавт. /1982/;малатдегидрогеназная по Kun et.al./1963/;лактатдегидрогеназная по Schwer et.al. /1963/;3-оксибутиратдегидрогеназная - по Brady /1986/; глюкозо-6-фосфатазная - по Львовой /1985/; фруктозо-1,6-дифосфатазная - по Орехович и соавт./1964/.

Для определения уровня активности митохондриальных ферментов проводили выделение митохондрий методом дифференциального центрифугирования /Schachman ,1959/ в модификации /Арсан,1980;Casej ,1982/,с дополнительной очисткой в градиенте плотности сахарозы 0,32-1,2М /Арутюнян,1978/. Чистоту митохондриальной фракции контролировали с помощью электронного микроскопа /Уикли,1975/.

С целью изучения особенностей взаимопревращения 2-оксоглутарат-глутамат в митохондриях мозга молоди рыб уровень соответствующих ферментативных активностей определяли по известным методам: NADP-глутаматдегидрогеназу - спектрофотометрически по Olson,Anfinson /1952/ в некоторой модификации: 2-оксоглутаратдегидрогеназу - спектрофотометрически по Зиничу/1986/; спектрофотометрически ферментативным методом было также определено содержание 2-оксоглутарата /Bergmeyer ,1963/. Кроме

того глутаминсинтетазу - фосфатным методом по Евстигнеевой и соавт./1980/;глутаминазу - по Магарламову и соавт./1979/;аммиак - по Seligson et.al./1951/; глутамин - по Силаковой и соавт./1962/;глутамат - бумажной хроматографией по Пасхиной /1964/. Содержание белка определяли методом Лоури/1951/.Статистическую обработку результатов осуществляли по Ойвину/1960/.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Динамика содержания резервных энергетических компонентов тканей молоди карпа в процессе зимовки.

При исследовании зимнего голодания рыб возникает вопрос о соотношении снижения интенсивности метаболизма с одной стороны и поддержания достаточного уровня энергетического гомеостаза для жизнедеятельности - с другой. Причем формы аккумуляции энергии у животных по Шульману /1972/ определяют несколькими путями, важнейшим из которых является уровень резервных жиров,углеводов и белков.

В результате наших исследований установлено, что во всех изучаемых тканях рыб в период зимовки происходит интенсивное расходование общих липидов. Это,вероятно,объясняется тем,что запасы энергии в теле рыб аккумулируются в форме нейтральных жиров - триацилглицеринов /Lowern,1964;Шатуновский,1967/,которые составляют до 75% всей массы резервного жира рыб/Linko, 1964/.В начальный период зимовки более быстро расходуются липиды печени/за 4 месяца уменьшение в 2,5раза/,т.к.печень - основное место окисления и синтеза липидов /Романенко,1978; Jezierska, 1982/.В течение всего процесса зимнего голодания наибольшие потери общих липидов наблюдаются в белой мускулатуре /87%/.Это вероятно связано с преобладающим содержанием в мышечной ткани триацилглицеринов,которые относительно быстро обмениваются при мобилизации и ресинтезе жировых резервов /Kinsella,1966/.При изучении содержания общих липидов в тканях двух групп рыб в апреле /после окончания зимовки/показано,что различий в количественных показателях исследуемого параметра в белых мышцах, печени и мозге слабых и сильных особей карпа не обнаруживается. Таким образом можно сделать вывод, что при эндогенном питании в условиях зимнего голодания жировые запасы необходимы и их накопление осуществляется к осени, достигая наибольших величин /в мышцах - 6,06±1,18%; в

печени - 18,49±3,63%;в мозге - 26,62±4,62%/.В течение зимовки происходит интенсивное использование общих липидов, но в вопросе выживаемости содержание общих липидов в тканях молоди карпа не играет, по-видимому, решающей роли.

Для органов рыб,в особенности мышечной ткани, не характерно высокое содержание глюкозы и гликогена /Tarr,1958;Ананичев,1961/. Мы не наблюдали накопление глюкозы и гликогена в тканях молоди карпа в осенний период. Если жировые запасы с переходом рыб на эндогенное питание к середине зимовки интенсивно расходовались и их уровень резко снижался во всех исследуемых тканях, то содержание и гликогена, и глюкозы к февралю наоборот увеличивалось /для глюкозы в мышцах до 35,6±7,3; в печени до 132,6±11,7;в мозге до 31,5±2,6 мг%/.Полученные результаты можно объяснить,исходя из исследования необратимых реакций глюконеогенеза. Так, увеличение активности цитоплазматических Г-6-Фазы и Ф-1,6Дфазы, характеризующих уровень глюконеогенеза в целом, в печени зимующей молоди рыб,свидетельствует об активизации этого процесса к середине зимовки /февраль/ Созданные в январе-феврале запасы гликогена в тканях карпа весной дают возможность организму получать глюкозу обычным путем /посредством гликогенолиза/, не расходуя так нужные в весенний период макроэргические соединения в процессе глюконеогенеза.Это отражается на уровнях активности Г-6-Фазы и Ф-1,6-Дфазы.В апреле они значительно меньше,чем зимой, что также ведет к уменьшению содержания глюкозы и гликогена во всех исследуемых тканях в апреле по сравнению с февралем. Величина гликогена в мозге в апреле,равная 156,0±19,5мг%,превышающая осенний показатель, доказывает невозможность значительных накоплений этого углевода перед зимовкой и об обязательном минимальном их количестве, особенно в печени и мозге.Когда же этого не происходит, что мы видим сравнивая данные двух групп рыб по скончанию зимовки,возможна их гибель из-за недостатка энергетических субстратов.

Известно,что другими важнейшими энергетическими субстратами для малоподвижных рыб являются свободные аминокислоты и белок /Greac'и,1966;Шульман,1972/.В связи с этим была изучена динамика содержания белка и свободных аминокислот в мышечной ткани сеголеток в условиях зимовки.В результате исследований

установлено,что с октября по январь в мышечной ткани сеголеток количество свободных аминокислот уменьшается в 6 раз;при этом степень расходования серина,глицина,аланина,гистидина, лейцина и изолейцина в 3-6 раз больше,чем других аминокислот. Расходования общих белков за этот период не происходит.Однако обнаружены уменьшения количества белков,растворимых в воде и 5% растворе хлорида натрия; количество нерастворимых белков возрастает.В феврале после истощения запаса свободных аминокислот энергетическая мобилизация белков мышц увеличивается. Содержание общего белка в феврале ниже в 2 раза,чем в декабре;отдельных фракций белка тоже меньше в 2 раза,но по сравнению с октябрем.Количество свободных аминокислот при этом увеличивается.Объяснением этого может служить активизация лизосомальных протеаз /Creac'h,1965,1969;Сидоров,1987/.Таким образом в процессе зимнего голодания молоди карпа исключительно важное значение в энергетическом метаболизме,по-видимому, играют свободные аминокислоты и белки мышечной ткани.Первые являются энергетическим субстратом на начальных стадиях голодания,вторые - эндогенными ресурсами питания организма во второй половине физиологического ритма голодания.Это позволяет считать высокий уровень свободных аминокислот до голодания одним из определяющих факторов успешной зимовки,что подтверждается результатами исследований изучаемых показателей у двух групп рыб.Годовики первой группы /сильные/ отличаются от второй /слабые/ более высоким содержанием как суммы свободных аминокислот,так и уровнем каждой из них,особенно это относится к глицину,аланину,серину,аспарагиновой кислоте,лизину,концентрация которых у слабых годовиков в 2,5 раза ниже,чем у сильных. Аналогичные изменения наблюдаются и в содержании белков.Например,их концентрация в нерастворимой фракции мышечной ткани слабых годовиков в 7,5 раза ниже,чем у сильных. Таким образом,слабые,гибнущие в результате зимовки карпы отличаются от хорошо перенесших зимовку прежде всего содержанием наиболее важных аминокислот и нерастворимых белков.Опыты, проведенные на протяжение трех лет,показали,что выход годовиков карпа из зимовки коррелирует с относительным содержанием в их мышцах свободных аминокислот.Установлено,что в 1984 году до зимовки молодь рыб характеризовалась содержанием около 15

мкмоль аминокислот на 1г сухой ткани мышц и ее гибель после зимовки была наиболее значительной - 68%. В другие годы исследуемый показатель составлял 50,16 /1983/ и 30,20мкмоль на 1г сухой ткани мышц/1985/.Соответственно выход молоди в эти годы составил 85% и 82%.Установленный уровень /около 15мкмоль на 1г ткани/,согласно проведенным исследованиям,по-видимому,можно считать критическим.

2.Состояние энергогенерирующей системы в тканях молоди рыб в период и по окончанию зимовки.

Общеизвестно,что зимовка рыб представляет собой не пассивный процесс,в котором замедлены или отсутствуют обменные реакции,как у многих зимоспящих млекопитающих,а адаптивно метаболически активный период жизни экзотермных животных,при котором они переходят на эндогенное питание.Однако голодание можно рассматривать не только как переход на экономное эндогенное питание организма,но и как состояние длительного стресса,связанное с изменением активности многих ферментов.Процесс окислительного фосфорилирования, снабжающий клетку макроэргическими фосфорными соединениями зависит от функционального состояния гликолиза и трикарбонового цикла,о котором можно судить как по активности отдельных ферментов,так и по изменению концентрации самих метаболитов. Так,количественное исследование оксалоацетата,малата,пирувата и лактата показало,что в осенний период не происходит накопления исследуемых метаболитов в белой мускулатуре,печени и мозге сеголеток карпа.В октябре наименьшее содержание вышеперечисленных метаболитов среди изученных тканей наблюдается в белых мышцах /для оксалоацетата 0,15±0,01;для лактата 0,18±0,03 мкмоль на 1г ткани; для пирувата 3,36±0,18;для малата 1,65±0,05 мкмоль на 100г ткани/;наибольшее - в печени.В феврале,когда температура воды снизилась имеет место достоверное уменьшение уровня оксалоацетата в мышцах,пирувата и малата в мышцах и печени.В то же время содержание лактата увеличилось,т.е.в тканях возможно происходит активирование гликолитических процессов.Это подтверждается как снижением окислительной способности клеток мышц и печени,рассчитанной по соотношению свободных NAD-пар; так и возрастанием лактатдегидрогеназной активности,особенно в печени зимующих рыб.Для ферментов трикарбонового цикла су-

ществует тканевая специфичность в изменении митохондриальной активности в течение зимовки молоди карпа. Если, для белой мускулатуры характерно наибольшее значение СДГ-азной активности в осенний период и уменьшение ее с понижением температуры воды, то для печени и мозга зафиксированы противоположные тенденции, т.е. возрастание исследуемой активности в 3 и в 6 раз соответственно. МДГ-азная активность в этот период в митохондриях печени снизилась в 2 раза, в белой мускулатуре - в 2,5 раза, а в той же фракции мозга наблюдается незначительное ее увеличение. Таким образом в период зимнего голодания на молодь карпа оказывают влияние два важнейших фактора: голодание и температура. Известно, что активность ферментов, связанных с циклом Кребса и переносом электронов значительно возрастает при акклимации к холоду рыб/Лав, 1976; Shaklee, 1977; Хочачка, 1988/ и снижается при голодании, особенно в мышцах /Сорвачев, 1982; Vijayaraghavan, 1985/. Поэтому адаптивный ответ пойкилотермного организма на каждый из них может быть противоположным, что мы и наблюдаем в данном исследовании. По мере повышения температуры воды и окончания периода зимовки в митохондриях исследуемых тканях происходит увеличение ферментативной активности. Наиболее высокий уровень МДГ-азной и СДГ-азной активности в этот период имеет место в митохондриях мозга /2,91±0,33 мкмоль NADH на мг белка за мин.; 6,22±0,44 нмоль сукцината на мг белка за мин./. Сравнивая данные по МДГ-азной активности цитоплазмы и митохондрий, на протяжении всей зимовки, можно заметить, что отношение активности митохондриальной к цитоплазматической в мозге больше единицы, в других тканях - меньше единицы. Как уже отмечалось раннее, после зимнего голодания рыб, последние были разделены на две группы: первая/сильные/, вторая/слабые/. Анализ мышечной ткани, печени и мозга этих рыб показал, что у молоди карпа второй группы содержание пирувата, лактата, оксалоацетата меньше, а малата значительно меньше, чем у первой. При этом уровень малатдегидрогеназной активности обеих фракций в исследуемых тканях первой группы рыб наиболее отличается от второй, что отражается на содержании субстратов, которые окончательно истощаются, ингибируя активность энергогенерирующих реакций /Островский, 1984/. В результате этого возникает энергодефицит и возможна гибель рыб.

Известно,что жизнедеятельность пойкилотермных организмов зависит от энергообеспеченности важнейших органов рыб,т.е.от уровня макроэргических соединений и в первую очередь от количества АТР,а также от соотношения адениловых нуклеотидов.В процессе всего периода зимовки /ноябрь-апрель/в белой мускулатуре,печени и мозге карпа происходят значительные изменения в содержании аденозинфосфатов. Наиболее резкое уменьшение уровней АТР,АДР в исследуемых органах отмечается за первые два месяца зимовки.Количество АМР в тканях в октябре наименьшее,к февралю оно увеличивается в мышцах до 0,60±0,02;в печени до 0,26±0,01;в мозге до 0,20±0,01 мкмоль на 1г ткани.Затем практически не меняется в белой мускулатуре и в мозге до окончания зимовки,достоверно возрастая в печени.В апреле после анализа тканей двух групп рыб было установлено,что у слабых особей содержание исследуемых адениловых нуклеотидов,их сумма значительно меньше,чем у сильных.Например,в печени количество АТР в 6 раз,а в мозге в 4 раза больше у сильных особей. Что касается соотношения АТР/АДР,то у второй группы рыб оно изменяется в пользу АДР как в печени,так и в мозге. Характерно,что во всех изучаемых тканях АЭЗ/аденилатный энергетический заряд/ почти не изменяется у двух групп рыб в апреле,хотя в середине зимовки можно наблюдать его снижение во всех исследуемых тканях.Проведенные расчеты показывают возрастание содержания АМР в белой мускулатуре ровно вполовину уменьшения количества АДР, что дает возможность предположить,что дополнительный ресинтез АТР происходит с помощью миокиназной реакции, выраженной следующим уравнением:АДР+АДР → АТР+АМР. Что касается меньшего содержания АТР в это время, то объяснением служит использование данного макроэрга для поддержания жизнедеятельности рыб. В ткани мозга молоди карпа протекают аналогичные процессы.Для печени резкое снижение количества АДР и особенно АТР за первый период голодания объясняется очевидно важностью данного органа для поддержания гомеостаза внутренней среды организма, требующего повышенных энергетических затрат,в таких процессах как глюконеогенез и пентозофосфатный шунт,активизирующихся в зимний период /Ньюсхолм,1977;Щербина, 1978;Хочачка,1988/.Еще одним доказательством нашего предположения служат изменения отношений действующих масс аденилаткиназной реакции.Данный показатель возрастает к январю во

всех исследуемых тканях. К апрелю продолжает увеличиваться в белой мускулатуре и в гепатопанкреасе,в мозге сохраняется в тех же пределах.Косвенным доказательством может служить довольно высокий уровень АЭЗ в апреле,который можно объяснить АМР-дезаминазным механизмом /Lowengstein,1972/,согласно которому снижение аденилатного энергетического заряда компенсируется дезаминированием АМР и ИМР. По выходе рыб из зимовки наблюдается повышение количества АТР и АДР в белой мускулатуре и в печени сильных особей карпа по отношению к январю.Можно предположить адаптивные перестройки обмена веществ и энергии рыб к эндогенному питанию,при котором интенсивно используются свободные аминокислоты и белки мышечной ткани.Происходит также рост уровней активности ферментов ЦТК,увеличение содержания некоторых метаболитов,как например малата во всех тканях в первой группе рыб по сравнению со второй.

3.Адаптивные изменения функционирования ферментативной системы энергетического обмена.

Поддержание энергетического гомеостаза обеспечивается не только стационарной работой цикла трикарбоновых кислот.Известны и другие механизмы выработки энергии в клетке,служащие для обеспечения достаточного уровня лабильности и являющиеся специфической метаболической адаптацией,одной из которых есть миокиназный ресинтез АТР.С целью доказательства существования миокиназного пути ресинтеза АТР в тканях рыб,в марте был проведен опыт на молоди карпа,выдерживаемой в естественных условиях водоема.Были установлены изменения содержания аденилових нуклеотидов в белых мышцах,печени и мозге годовиков карпа при функционировании и ингибировании аденилаткиназы.Так,уменьшение содержания АДР в исследуемых тканях соответствует и несколько больше,чем возрастание суммы АТР+АМР.Последние можно объяснить высокой активностью АМР-дезаминизы в тканях рыб в этот период /Lowengstein,1972/.Осуществление ресинтеза АТР только миокиназным путем невозможно,так как произойдет снижение общего содержания аденилатов,что приведет к нарушению стационарности оптимального уровня затрат энергии.Известно, что поддержание энергетического баланса организма служит основой процесса адаптации /Хаскин,1975/.Для выживаемости рыб в условиях зимнего голодания с целью обеспечения их энергией и осуществления процессов дыхания и гликолиза необходимы допол-

нительные источники энергии,одним из них могут быть кетоновые тела.

Известно,что у рыб система катаболизма жирных кислот приспособлена для их интенсивного использования в качестве энергетического субстрата:при адаптации,продолжительном плавании, голодании у рыб не наблюдается значительного накопления кетоновых тел в крови,как это происходит в аналогичных ситуациях у млекопитающих /Hochachka, 1962/.Наше исследование отразило изменения в содержании кетоновых тел в тканях молоди карпа на протяжении всей зимовки.Установлено,что наиболее низкий уровень кетоновых тел и наиболее высокий уровень 3-оксибутиратдегидрогеназной активности /8,06±1,02 нмоль NAD^+ на 1мг белка за 1мин./в октябре наблюдается в белой мускулатуре,что подтверждает первоочередность расходования общих липидов в мышечной ткани. В опытах,проведенных в середине зимовки /февраль/ обнаружено резкое увеличение содержания 3-оксибутирата в мышцах, ацетоацетат в печени,обоих веществ - в мозге. Причиной этого может быть снижение уровня ОБДГ-азной активности,вероятно, связанной со значительным израсходованием в этот период резервных жиров,а также с возможностью существования у зимующих рыб,как и у млекопитающих животных, механизма образования кетоновых тел по схеме: 2ацетилСоА → ацетоацетилСоА→ацетоацетат → 3-оксибутират. Уменьшение содержания оксалоацетата /в мышцах до 0,08±0,02 мкмоль на 1г ткани/ в процессе зимовки, начиная с февраля,по-видимому,способствует к переориентации ацетилСоА из цикла трикарбоновых кислот на синтез кетоновых тел по вышеприведенной схеме. Кроме того исследование двух групп рыб в апреле,показавшее пониженное содержание оксалоацетата в печени и глюкозы в мозге у слабой молоди карпа по сравнению с сильными может служить доказательством наличия вышеописанного компенсаторного механизма образования кетоновых тел в качестве добавочного энергетического субстрата.Более высокая ОБДГ-азная активность в периферических тканях второй группы рыб подтверждает данный вывод. Концентрация кетоновых тел представляет собой баланс между образованием их в печени и утилизацией в периферических тканях/Аникеева,1987/. Это равновесие наблюдается в данном случае;в печени на протяжении зимовки уровень 3-оксибутиратдегидрогеназной активнос-

ти практически не менялся /октябрь 1,74±0,19;февраль 2,20±0,43; апрель: сильные 1,80±0,88;слабые 1,81±0,38 нмольNAD* на 1мг белка за 1мин/.Это может свидетельствовать об отсутствии утилизации кетоновых тел в печени и расходовании их в мозге и мышцах.Накопление этих веществ в периферических тканях второй группы рыб, вызывает интоксикацию организма,нарушение буферного гомеостаза и служит одной из возможных причин гибели зимующей молоди рыб.

Еще одним высокотоксичным веществом,которое может вызвать отравление рыб в условиях энергодефицита является аммиак,т.к.установлено,что он - конечный продукт обмена азотсодержащих веществ в организме карповых рыб,а не мочевина /Creac'h et. al.1963,1966,1967/.Кроме того как было сказано выше в условиях зимнего голодания возрастает доля свободных аминокислот и белков в качестве источника энергии для организма рыб,а также происходит интенсификация дезаминирования небелковых азотистых субстратов /Creac'h 1966;Kaffin 1990/.В наших исследованиях в феврале наблюдается достоверное /на 4,75 мкмоль/увеличение содержания глутамина в мозге молоди рыб,что коррелирует со значительным возрастанием в этот период активности глутаминсинтетазы,достигающей 9,30±0,67 мкмоль P_i на 1мг белка за 1мин.,являющейся одним из основных ферментов детоксикации аммиака у рыб /Creac'h1974/.Однако накопление аммиака /231,33±20,96 мкмоль на 100г ткани/к середине зимовки может свидетельствовать о недостаточной эффективности его связывания в нетоксичный глутамин в глутаминсинтетазной реакции из-за возникновения у зимующей молоди карпа энергодефицитного состояния.В таких условиях возможно включение других механизмов детоксикации аммиака. Одним из них является восстановительное аминирование 2-оксоглутаровой кислоты с образованием глутаминовой.Известно,что равновесие ГДГ-азной реакции сдвинуто обычно в сторону синтеза глутамата /Krebs, 1969/.Поэтому, обнаруженное нами наибольшее количество 2-оксоглутарата в мозге рыб в сентябре /1,95±0,23мкмоль на 100г ткани/подтверждает потенциальную возможность участия NADP-глутаматдегидрогеназы в детоксикации аммиака.Происходящий при этом отток важнейшего промежуточного продукта цикла Кребса - 2-оксоглутарата не влияет на работу ЦТК.т.к. реакции,отвлекающие промежу-

точные продукты из лимонного цикла и реакции,восполняющие их убыль при нормальных условиях находятся в состоянии динамического равновесия.Концентрация 2-оксоглутарата в митохондриях мозга исследованных рыб на протяжении первых 4-х месяцев зимовки изменялась недостоверно /$p<0,1$/.Однако к концу зимовки при изучении двух групп рыб,мы установили резкое уменьшение /в 22 раза/в содержании 2-оксоглутарата в мозге сильных рыб по сравнению с сентябрем. Кроме того,содержание глутамина и уровень глутаминсинтетазной активности с февраля по апрель снизился,особенно у рыб второй группы.Из этого следует,что концентрация аммиака,образующегося в это время за счет утилизации аминокислот должна возрасти.Однако этого не произошло,количество аммиака наоборот снизилось /у сильных особей до $78,40\pm6,35$; у слабых до $143,08\pm9,37$мкмоль на 100г ткани/.Это позволяет предположить возможность связывания аммиака вне глутаминсинтетазного пути,т.е. в NAIP-глутаматдегидрогеназной реакции,активность которой у слабых особей больше,чем у сильных,что привело к возрастанию глутамата до $23,70\pm1,99$мкмоль на 100г ткани в мозге слабых рыб. Таким образом следует предположить возможность оттока 2-оксоглутарата из пула субстратов ЦТК в митохондриях мозга молоди карпа весной,по выходе их из зимовки.Невозможность компенсаторного восполнения промежуточных метаболитов из-за недостаточности питательных субстратов и дефицита энергии может вызвать нарушение процессов выведения аммония и, вероятно,является одной из причин гибели рыб.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате настоящей работы установлена важная роль углеводов,липидов,особенно,белка и свободных аминокислот в эндогенном питании сеголеток в условиях зимнего голодания.Рассмотрены возможности выбора цикла для рециркуляции глюкозы и лактата между мышцами и печенью,которые зависят от состояния редокс-системы,а также вопросы энергообеспеченности белой мускулатуры,печени и,особенно,мозга в связи с направленностью взаимопревращения 2-оксоглутарат-глутамат в митохондриях клеток этого органа.

Проведенные исследования служат доказательством предположения о существовании адаптивных перестроек обмена веществ и энергии,направленных на выживаемость молоди карпа в услови-

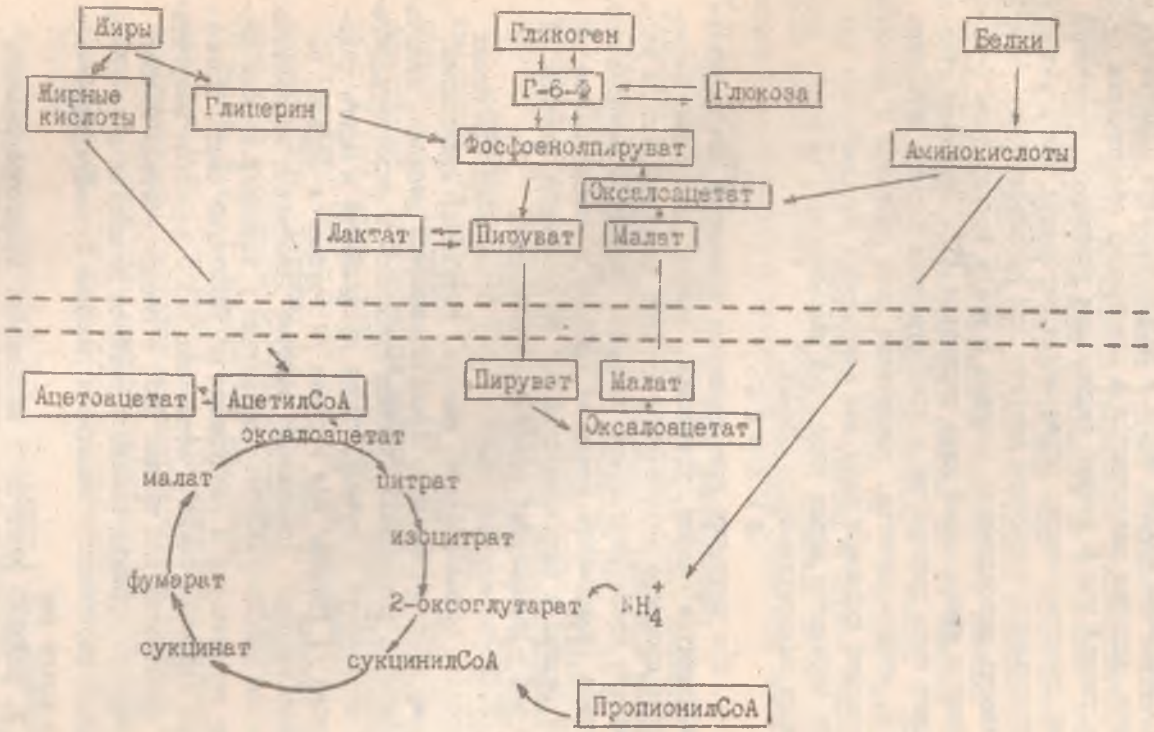

Рис. 1. Общая схема особенностей метаболизма энергетических компонентов у зимующей молоди карпа.

ях зимнего голодания. Обобщение полученных результатов позволяет предложить общую схему, отобращающую особенности метаболизма у зимующей молоди карпа и направленность адаптивных механизмов, которые заключаются в следующем: обеспечение субстратами тканей рыб в зимний период для успешного протекания реакций глюконеогенеза; образование кетоновых тел в качестве дополнительного источника энергии для периферических тканей; возможность детоксикации аммиака в мозге посредством 2-оксоглутарата и миокиназный путь ресинтеза АТР. Решением этих задач может быть применение в искусственных кормах витаминов групп В, микроэлементов, увеличение доли протеина и развитие естественной кормовой базы для накопления биохимически важных для сеголеток карпа свободных аминокислот, белков и стабилизации энергетического обмена.

В Ы В О Д Ы

1. При изучении использования возможных энергетических компонентов /жиров, углеводов, белков, свободных аминокислот/ в процессе эндогенного питания зимующей молоди карпа показано преимущественное значение свободных аминокислот. Обнаружена зависимость между их уровнем в мышцах сеголеток в осенний период и выживаемостью рыб по окончанию зимовки /% выхода рыб - рыбоводный показатель зимовки/.

2. Установленное преобладание содержания свободных аминокислот, оксалоацетата, малата, пирувата, аденилатов, отношения действующих масс аденилаткиназной реакции, величины фосфатного потенциала, уровня сукцинат- и малатдегидрогеназной активности в печени, белой мускулатуре и мозге сильных особей /1 группа/ над слабыми /2 группа/ в апреле, по окончанию зимовки, доказывает наличие адаптивных механизмов сохранения энергетического гомеостаза у зимующей молоди карпа. Оно заключается в следующем: а/ усиленный синтез глюкозы путем глюконеогенеза и кетоновых тел в качестве энергетических субстратов для тканей рыб, в первую очередь мозга; б/ протекание аденилаткиназной реакции ресинтеза АТР; в/ детоксикация избыточного аммиака в реакции 2-оксоглутарат-глутамат в мозге рыб.

3. Найдены различия в механизмах энергообеспечения

мозга, печени и белых мышц рыб в условиях зимовки, заключающиеся в усилении гликолитических процессов в мышцах и печени к середине зимовки. Об этом свидетельствует увеличение содержания лактата и возрастание уровня активности лактатдегидрогеназы. Для мозга характерно увеличение сукцинатдегидрогеназной, малатдегидрогеназной активности на протяжении всей зимовки. В этот период в тканях молоди карпа наблюдается повышение уровня концентрации восстановительных эквивалентов, что ведет к снижению окислительной способности клеток.

4. Предложен новый критерий отбора рыб на зимовку - определение количества свободных аминокислот в мышцах в осенний период, исходя из того, что 15 мкмоль на 1 г сухой ткани является критической концентрацией. Поэтому в период подготовки молоди карпа к зимовке при разработке кормовых смесей нужно учитывать необходимость повышения уровня свободных аминокислот в их организме.

Список основных работ по теме диссертации:

1. Яковенко Б.В., Грубинко В.В., Жиденко А.А., Явоненко А.Ф. Сезонная динамика глицина в водоемах и мышечной ткани карпа // Гидробиол.журн.- 1985.- №6438-85 Деп. - 11 с.
2. Яковенко Б.В., Грубинко В.В., Третяк А.П., Жиденко А.А., Явоненко А.Ф. Исследование ферментов дезаминирования глицина в мышечной ткани карпа чешуйчатого // У Всесоюз.биохим.съезд: Тез.стенд.сообщ. М.:Наука,1986.-Т.3.-С.291-292.
3. Жиденко А.А., Явоненко А.Ф., Грубинко В.В. Роль свободных аминокислот в выживаемости молоди карпа в условиях зимовки // У Укр.биохим.съезд: Тез.докл., Ивано-Франковск,сент. 1987г.- Киев:1987.- Ч.1.- С.56-57 /на укр.языке/.
4. Яковенко Б.В., Жиденко А.А., Явоненко А.Ф. Влияние температуры на содержание глицина в отдельных органах карпа // Там же Ч.2.- С.324-325 /на укр.языке/.
5. Явоненко А.Ф., Яковенко Б.В., Грубинко В.В., Жиденко А.А. Ферментативная адаптация азотистого обмена карпа к голоданию // Первый Всес.симп.по экол.биох.рыб:Тез.докл., Ярославль,окт.1987г.-Ярославль:Акад.наук СССР,1987.-С. 224-226.

Явоненко А.Ф., Яковенко Б.В., Грубинко В.В., Жиденко А.А. Глутаминсинтетазная и глутаминазная активность в организ-

ме молоди карпа при выходе из зимовки //Рыб.хоз-во.-1988. -Вып.42.- С.45-49.

7. Грубинко В.В., Жиденко А.А., Явоненко А.Ф. Конкурентные взаимоотношения NADP -глутаматдегидрогеназы и α-кетоглутаратдегидрогеназы в митохондриях мозга зимующей молоди карпа //Экол.энерг.жив.:Тез.докл.Всесоюз.Совещ.,Суздаль,31окт. -3 нояб. 1988г.- Пущино:Акад.наук СССР.- С.54-55.
8. Явоненко А.Ф., Яковенко Б.В., Грубинко В.В., Жиденко А.А. Особенности функционирования ферментативных путей образования энергии у карповых рыб в условиях зимовки //Там же С.214-216.
9. Жиденко А.А., Грубинко В.В., Явоненко А.Ф. Особенности метаболизма кетоновых тел у зимующей молоди карпа //Экологическая физиол.и биох.рыб: Тез.докл. У11 Всесоюз.конф.,Ярославль, май 1989г.- Ярославль:Акад.наук СССР,1989.-Т.1.- С. 137-138.
10. Явоненко А.Ф., Яковенко Б.В., Грубинко В.В., Жиденко А.А. Зависимость выживаемости молоди карпа в условиях зимовки от содержания свободных аминокислот и белков в мышечной ткани рыб // Рыб.хоз-во.- 1989.- Вып.43.- С.24-29.
11. Жиденко А.А., Яковенко Б.В., Явоненко А.Ф. Состояние энергогенерирующей системы в тканях у зимующей молоди карпа //Гидробиол.журн.-1990.- №61-В 90 Деп.- 26 с.
12. Жиденко А.А., Грубинко В.В., Явоненко А.Ф. Роль кетоновых тел в энергообеспечении пойкилотермных организмов в условиях зимнего голодания //Укр.биохим.журн.-1990.-62,№5.- С. 72-76.