

БІОХІМІЯ

УДК 577.121.7:597.554.3

В.В. Грубінко¹, В.О. Арсан², І.М. Коновець²

¹Тернопільський державний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка
46027 Тернопіль, вул. М.Кривоноса, 2

²Інститут гідробіології НАН України
04210 Київ, пр. Героїв Сталінграда, 12

ЕНЕРГЕТИЧНИЙ СТАТУС ОРГАНІЗМУ РИБ ЗА ІНТОКСИКАЦІЇ АМІАКОМ

аміак, інтоксикація, енергетичні субстрати, енергетичні цикли, аденілатний енергетичний заряд, корон

Забруднення внутрішніх водойм, включно рибогосподарських, є одним з лімітуючих факторів функціонування водних екосистем та їх біопродуктивності. У зв'язку з цим вивчення фізіолого-біохімічних механізмів адаптації та обмінних процесів у риб в умовах забруднення водних екосистем токсикантами є однією з головних умов розробки ефективних засобів та способів підвищення стійкості їх організму до нових умов існування.

Найбільшу небезпеку для риб становлять ті речовини, які у фізіологічних концентраціях є інтермедіатами обміну речовин у них, і одночасно за підвищення вмісту у водному середовищі та організмі — токсикантами. Одним із таких метаболітів риб є аміак.

Дослідження впливу аміаку на риб актуальне принаймні з декількох причин. По-перше, вклад аміаку у формування токсичності водного середовища значний завдяки інтенсивним процесам анаеробної біодеструкції у водоймах, частка яких останнім часом зростає внаслідок підвищення загального забруднення водойм. По-друге, аміак є біополітантом гідробіонтів і нагромаджується у водному середовищі у значних концентраціях при застосуванні методів інтенсивного риборозведення та у системах аквакультури з замкненим водопостачанням. По-третє, відомо, що за несприятливої дії абіотичних факторів середовища (неоптимальні температури, голодування, гіпоксія і ін.) та за дії будь якого токсиканту у організмі риб посилюється катаболізм білків, за рахунок чого утворюються значні кількості ендогенного аміаку, який є вторинним токсикантом поряд з токсикантом-індуктором. По-четверте, оскільки аміак є проміжною сполукою обміну речовин у риб, кінцевим продуктом азотого метаболізму і водночас у високих концентраціях токсикантом, слід очікувати, що у риб до цієї речовини, як і до інших аналогічних метаболітів, в процесі еволюції виробилися ефективні захисні механізми адаптації та внутрішньоклітинні системи регуляції метаболізму. Тому інтоксикація організму риб аміаком є зручною моделлю для дослідження механізмів забезпечення фізіолого — біохімічної адаптації риб до токсикантів. Розуміння останнього може мати як значне теоретичне, так і практичне значення у пошуку засобів корекції обміну речовин у риб за токсичних умов, оскільки механізми їх адаптації до токсикантів можуть бути універсальними, так само, як до інших абіотичних факторів середовища [48]. Якщо структурна організація і функціонування адаптивних систем в останньому випадку досить добре відомі, то формування адаптивних функцій у організмі риб до токсикантів на фізіолого-біохімічному рівні практично не вивчена. Крім того, у даний час дослідження впливу токсикантів на

гідробіонтів обмежується встановленням LD_{50} та констатацією порушень токсикантом певних функцій у організмі. Тим часом, за даними [46] відповідь організму на дію токсиканту є результатом взаємодії двох процесів: деструктивних (пошкодження) та компенсаторно-адаптивних (захисних). Їх співвідношення визначає рівень токсичності водного середовища для риб та витривалість гідробіонтів до дії токсикантів. Однак щодо жодного токсиканту в даний час співвідношення фізіолого-біохімічних механізмів пошкодження та адаптивно-компенсаторні реакції не досліджено. Модель аміакового токсикозу є зручною для дослідження цих процесів. Проте дані про особливості енергетичного забезпечення організму риб при інтоксикації аміаком досить різноспрямовані і несистемні.

Характерним для гідробіонтів явищем, яке пов'язане з можливістю та високою швидкістю анаеробного окиснення білків у їх організмі і необхідністю протікання цього процесу через часте виникнення кисневого голодування та низьку інтенсивність аеробного окиснення вуглеводів і ліпідів є використання білків і інших азотистих сполук як енергетичних субстратів [40, 49]. У видів, які характеризуються низьким споживанням кисню (до них належить і короп), це явище має місце навіть при високому його рівні у водному середовищі. У додаток до цього, будь-яка токсична дія приводить до збільшення інтенсивності обміну білків що проявляється у посиленні катаболічних процесів. Зниження рівня загального білку у печінці, м'язах та нирках риб виявлено за дії фенолу [23], пестицидів [71, 72, 80, 84], важких металів [86], політоксикозах, викликаних комплексом токсикантів техногенного походження [24]. За рахунок цього в організмі риб відбувається інтенсивне продукування, а завдяки порушенню газобміну, нагромадження аміаку. Розвивається вторинний токсикоз, викликаний аміаком, який спричинює формування нейро-фізіологічного синдрому стресу. Аналогічні ефекти характерні і для токсичної дії екзогенного аміаку. У роботах [16, 74] зазначається, що дія екзогенного аміаку викликає його нагромадження у тканинах риб як за рахунок зниження виділення, так і завдяки посиленню утворення шляхом дезамінування азотистих органічних сполук. Свідченням останнього є зниження у тканинах риб, витриманих у токсичному по аміаку середовищі, вмісту білку [77] та збільшення за рахунок їх розпаду концентрації вільних амінокислот в крові [76].

Про стійкий катаболічний стрес-синдром за дії аміаку свідчить також активування ферментів дезамінування. У зябрах, печінці та м'язах намулистого стрибунка за аміакової інтоксикації виявлено зростання активності глутаматдегідрогенази і фосфат-залежної глутамінази та ферментів перерозподілу азотистих ресурсів організму — аланін- та аспартамінотрансфераз [55]. Авторі даної роботи вважають, що основним метаболічним шляхом амоніогенезу в цих умовах є глутаматдегідрогеназний шлях [20]. Підвищення інтенсивності його функціонування виявлено також в коропа, товстогубика і сома за дії аміаку в межах від 20 до 2000 мкг/л [63, 74]. У більшості цитованих вище робіт виявлені зміни пов'язуються з використанням рибами білкових ресурсів організму у процесах енергозабезпечення. Щодо останніх, то відомо, що адаптацію риб до ксенобіотиків (інсектицидів, хлорорганічних пестицидів, нафтопродуктів), в основному, забезпечують мітосомальні окиснювальні системи печінки, яка містить набір специфічних P450 та b5-цитохромзалежних оксидаз [36, 93]. Досить добре досліджено енергетичний обмін у гідробіонтів за дії на їх організм токсинів синьо-зелених водоростей [29, 30]. Встановлено, що вони викликають збільшення вмісту в печінці риб вітаміну B₁, фонду нікотинамідних коферментів, а також активують тіамінзалежні окиснювальні ферменти. Вплив важких металів, які першочергово діють на білкові структури ферментів, проявляється у порушенні ними асоціації апоферменту з коферментом [30] та структурній модифікації білків крові, печінки і м'язів, включно ферментів енергетичних циклів [19]. Перераховані речовини для організму риб є ксенобіотиками, тому у відповідь на їх дію відбувається підвищення інтенсивності обміну речовин та мобілізація енергетичних ресурсів організму у зв'язку з необхідністю ізольовання, перетворення і виведення цих сполук із клітин. При цьому значно збільшуються енерговитрати. Для забезпечення останніх активуються основні енергетичні цикли. За інтоксикації головний вклад в енергозабезпечення належить гліколізу [30]. Тому енергетична характеристика організму риб, інтоксикованих ксенобіотиками, аналогічна стану функціональної гіпоксії.

Щодо біохімічних механізмів енергетичної адаптації риб до дії токсичних рівнів власних екзометаболітів та біогенів, включно аміаку, то до останнього часу на їх вивчення звертали мало уваги.

Однак зрозуміло, що структурно-функційні зміни у зябрах, які спричинює аміак, приводять до зниження поглинання рибами кисню [16, 74] і розвитку у їх тканинах аноксії [58]. За рахунок цього відбувається мобілізація глікогену в гліколіз, яку за аміакової інтоксикації виявлено у коропа, сома та товстолоба [74], а також у мозамбікської тіляпії [51]. При цьому у зябрах та печінці виявили зростання активності фосфорилази і альдолази [51], а у печінці і крові - підвищення активності лактатдегідрогенази та рівнів глюкози, пірувату і лактату [74,78]. Збільшення вмісту аміаку у плазмі крові корелювало із зниженням рівня глікогену та збільшенням концентрації глюкози, пірувату і лактату. Спочатку вважали, що активування гліколізу є необхідним для додаткового продукування енергії, бо за аміакової токсикою у організмі риб зростає рівень енерговитрат [16, 66]. Однак, пізніше було показано, що аміак у мозамбікської тіляпії знижує активність ферментів ЦТК (ізоцитрат-, сукцинат-, малатдегідрогеназ), а також цитохром-с-оксидази [51], що приводить до зменшення у тканинах рівня АТФ і зростання концентрації ADP і AMP та зниження їх енергетичного резерву [51, 78]. Крім того, автори цих робіт відзначають збільшення активності у риб за дії на них аміаку глікозо-6-фосфатдегідрогенази і роблять висновок про можливість окиснення глюкози гексозомонофосфатним шляхом. Про збільшення анаеробного окиснення вуглеводів у коропа при дії екзометаболітів риб йдеться і в роботі [40]. Із зазначеного зрозуміло, що гліколіз у риб за дії аміаку є основним шляхом енергозабезпечення організму.

Тенденція до загальної деградації резервних енергетичних субстратів характерна і для ліпідів. У печінці, селезінці та сироватці крові коропа за дії аміаку у концентрації 1,5 та 2,5 ммоль/л знижується вміст загальних ліпідів та триацилгліцеринів [42]. Одночасно відмічено зростання рівня холестерину, фосфоліпідів та вільних жирних кислот. Останнє є ще одним свідченням розвитку у риб стійкого стрес-синдрому [32].

Виявлено певні взаємозв'язки між енергетичними системами та системами детоксикації і виведення аміаку в організмі риб. Відомо про функціонування метаболічного ланцюга: утворення аміаку у NAD(P)H-глутаматдегідрогеназній реакції у тканинах гідробіонтів, його фіксація в глутамін з участю глутамінсинтетази, транспорт останнього у зябра з наступним розщепленням глутаміназою і виділенням у зовнішнє середовище. Констатується універсальність такого механізму для всіх амоніотелічних тварин [34], включно для прісноводних кісткових риб (короп) [9]. З цього приводу слід зазначити, що дані ферментні ланцюги пов'язані з перетворенням аміно- та кетокислот, які є одночасно інтермедіатами вуглеводного та енергетичного обміну: глутамату, аспартату, глутаміну, 2-оксиглутарату, аланіну, пірувату, цукрату і ін. Зміну їх вмісту спостерігали у ряді випадків дії на риб різних токсикантів, які викликають внутрішньоклітинний амоніагенез: пестицидів — діелдрину [71, 72], трихлорфосу [82], атразину [79] метилпаратіону [83]; фенолу [23], важких металів [86]; сечовини [81]. С повідомлення, що за інтенсивного амоніагенезу у організмі мулистого стрібуна у мозку риб при зростанні рівня глутаміну у 10 разів в 10 та 2 рази підвищується активність глутаматдегідрогенази та глутамінсинтетази [62].

У віднові на дію аміаку виявлено також підвищення активності глутаматдегідрогенази у печінці, м'язах та мозку риб [62, 74, 78]. Однак, в останніх випадках механізми участі вказаних ферментів та їх функції у забезпеченні адаптації не вивчалися. Оскільки трансамінази і глутаматдегідрогеназа каталізують зворотні реакції і забезпечують рівновагу певних субстратів метаболічних циклів, в тому числі аміаку, або регулюють шляхом трансмембранного перерозподілу цих речовин спрямованість та інтенсивність обміну речовин, важливо дослідити роль даних ферментних шляхів у забезпеченні перерозподілу пулу інтермедіатів білкового, вуглеводного та енергетичного обміну.

Однак, проведені дослідження не дають відповідей на питання про те, який ступінь вкладу окремих субстратів у енергозабезпечення організму. Ще достатньо не досліджено роль окремих шляхів окиснення у енергозабезпеченні та підтриманні пулу інтермедіатів вуглеводно-енергетичного обміну і їх значення у формуванні адаптивних реакцій організму до аміаку. Не

вивчена роль таких додаткових метаболічних шляхів енергозабезпечення, які функціонують у риб за екстремального впливу на них факторів середовища, як синтез і окиснення кетонів тіл, міокіназна реакція, глюкозо-аланіновий цикл, гама-амінобутиратний шунт і ін. Глибокого аналізу відповіді організму риб на макромолекулярному і ферментному та мембранному структурно-функційному рівнях у їх взаємозв'язку, а також комплексних змін метаболічних систем у зв'язку з факторами їх регуляції, при дії аміаку не проведено. Накінець, головним недоліком проаналізованих досліджень є використання їх авторами в експериментах широкого спектру концентрацій аміаку (від 0,5 до 50,0 мг/л), серед яких є гранично допустимі, сублетальні, хронічно- та миттєволетальні. Значною варіабельністю характеризується також тривалість експозиції. Між тм, найсуттєвішим є дослідження відхилень за хронічної дії субграничних рівнів аміаку, оскільки тільки такі дослідження дають можливість виявити адаптивні зміни у організмі. Це дає змогу встановити чітку картину норми і на її основі здійснити індикацію спричинених аміаком пошкоджень, що важливо для розробки методів рибогосподарської та гідроекологічної біоіндикації.

З огляду на зазначене метою дослідження стала комплексна оцінка фізіолого-біохімічної відповіді системи енергозабезпечення організму риб за хронічної дії аміаку та розробка моделі енергетичної адаптації риб до підвищених рівнів аміаку.

Матеріали і методи досліджень

Досліди проведено на коропах *Cyprinus carpio* L. однорічного віку масою 180-200 г. Матеріал для експериментів відбирали з ставка, в якому постійно контролювався та витримувався у межах норми гідрохімічний режим та режим живлення риб кормом КПЦ-III-10 (Укр. НДІ рибного господарства) згідно рекомендацій з технології вирощування ставкових риб [45].

У лабораторних умовах короп витримувався у акваріумах об'ємом 200 л по 5 екз. з відстоююю водопрвідною водою та системами підтримання постійного газового та температурного режимів, які не відрзнялися від природних. Вміст кисню у воді акваріумів становив 7,0-8,0 мг/л, вуглекислого газу — 2,2-2,8 мг/л. Значення рН було близьким 7,7-7,9. Вміст основних катіонів та аніонів був близьким до норми [45]. Температура води підтримувалася автоматично і була аналогічною природній.

Фізіологічно небезпечними для коропа у розрахунку на неіонізовану форму є концентрації аміаку вище 0,07 мг/л. Тому дослідження проведені за рівня аміаку 0,10 мг/л. Аклімацію риб здійснювали протягом 14 діб. періоду, достатнього за даними [47] для формування адаптивних реакцій у організмі екстермних іварин. Зазначений рівень аміаку створювали внесенням розрахункових кількостей буферної суміші $\text{NH}_4\text{OH}:\text{NH}_4\text{Cl}$ з рН 7,2. Вміст аміаку у воді контрольних акваріумів становив $0,016 \pm 0,005$ мг/л. З метою підтримання сталого рівня аміаку в контрольних та дослідних акваріумах, а також для уникнення впливу власних ектометаболітів риб, кожних дві доби здійснювали зміну води та корекцію рівня аміаку. Вміст загального аміаку у воді визначали фотометрично за допомогою реакції Несслера [25].

Досліджували тканини м'язів, печінки, зябер, мозку та кров риб. Відбір крові здійснювали із синусу зябрової вени з використанням гепарину. Після препарування органів живих риб останні миттєво заморожували у рідкому азоті. Фракції ядер, мітохондрій, мікросом та цитозолу отримували центрифугуванням за стандартними методиками.

Для визначення вмісту метаболітів готували тканинні екстракти у охолоджену 6% свіжовиготовлену розчині хлорної кислоти [52]. Співвідношення тканина:розчин (маса:об'єм) становило 1:5.

Вміст аміаку в тканинах визначали мікродифузним методом [85]. Вміст глутамату та аланіну визначали на амінокислотному аналізаторі Г-339 (Чехія).

Загальний вміст білків у тканинах визначали мікробіуретовим методом [3], а їх кількість у екстрактах ферментних препаратів — за методом Лоурі і ін. [70].

Вміст кетокислот та оксикислот (піровиноградної, молочної, шавелево-оплової, α -кетоглутарової та яблучної) досліджували шляхом приготування небілкових тканинних

екстрактів у 6% розчині хлорної кислоти, який нейтралізували насиченим розчином карбонату калію до рН 7,0 [52]. У випадку дослідження тканин мозку додатково додавали етиловий спирт у розрахунку 0,1 мл на 1 мл екстракту для вилучення фосфоліпідів [55]. Кількість 2-оксиглутарату, пірувату, оксалоацетату, малату та глутамату визначали спектрофотометрично з використанням відповідних ферментів комерційного виробництва [53], а ширату — за [87]. Інкубаційні суміші при дослідженні відновлених форм субстратів готували на 0,1 М гідрозин-гліциновому буфері, а окиснені — на 0,5 М триетаноламіновому буфері.

Співвідношення нікотинамідних коферментів [NAD(P)⁺ / NAD(P)H] розраховували на основі значень концентрації субстратів лактат-, глутамат- та малат-дегідрогеназних систем з урахуванням відповідних констант реакцій [4, 73]. При розрахунку відношення NADP⁺/NADPH в цитоплазмі концентрацію CO₂ приймали на 25% нижчою, ніж у крові [39]. Вміст CO₂ в ній визначали за допомогою мікроаналізатора крові "Radekis".

Вміст аденілових нуклеотидів визначали шляхом приготування 8% хлорних екстрактів з подальшою тонкошаровою хроматографією на стандартних пластинках "Silufol" фірми Спектарол. Рівень неорганічного фосфору визначали за спектрами поглинання молібдатних комплексів за [18]. Вміст фосфатів (неорганічного та фосфору, зв'язаного у 2,3-дифосфоліцераті та АТФ) в еритроцитах визначали неферментним методом за Виноградовою І.Л. і ін. [8]. За показниками вмісту АТФ, АДФ, АМР та Р_i розраховували основні характеристики енергетичного стану клітини: адеплатний енергетичний заряд: АЕЗ = (АТФ + 1/2АДФ) / (АТФ + АДФ + АМР); енергетичний фосфатний потенціал — АТФ / (АДФ + Р_i) [50].

Вміст глюкози та глікогену визначали фотометричним методом за інтенсивністю забарвлення розчину з орто-толуїдиновим реактивом [1]. Глікоген попередньо гідролізували у щільному середовищі.

Загальний вміст ліпідів та триацилгліцеринів досліджували з використанням стандартного набору реактивів фірми Спектарол. При цьому тканини фіксували в системі хлороформ-метанол (2:1) та екстрагували за Фолчем [59]. Рівень вільних жирних кислот оцінювали за кольоровою реакцією з 1,5-дифенілкарбазидом за рекомендаціями Прохорової М.Ю. [37].

Кетовові тіла визначали в тих самих хлорних екстрактах, що і кетокислоти, в реакції з спиртовим розчином саліцилового альдегіду в насиченому розчині NaOH [7, 13]. Кількість ацетону визначали шляхом його попередньої відгонки з проб, а суму 3-оксибутирату та ацетоацетату — у залишку після їх попереднього окиснення до ацетону саліциловим альдегідом.

Крім того, досліджували активність ферментів **лактатдегідрогенази** (КФ 1.1.1.28) — спектрофотометрично при 340 нм згідно [60], **3-оксибутиратдегідрогенази** (КФ 1.1.1.30) — за методом [54]; **малатдегідрогенази** (КФ 1.1.1.37) — за зміною поглинання при окисненні NADH при 340 нм. [60], **6-фосфоглюконатдегідрогенази** (КФ 1.1.1.44) та **глюкозо-6-фосфатдегідрогенази** (КФ 1.1.1.49) — за інтенсивністю відновлення NADP⁺ при 340 нм. [41]; **2-оксиглутаратдегідрогенази** (КФ 1.2.4.2) — за методом [14], здійснюючи попередню інкубацію 7 хв. при постійному продуванні у суміш повітря, після 2 хв. якої до суміші додавали 2-оксиглутарат та малат в кінцевій концентрації 2 мМ, а стан фосфорилування створювали додаванням АДФ в кінцевій концентрації 10 мМ., **сукцинатдегідрогенази** (КФ 1.3.99.1) — фотометрично за [33]; **глутаматдегідрогенази** (КФ 1.4.1.2) — спектрофотометричним методом за зміною швидкості окиснення NAD(P)⁺ при 340 нм в 0,05 М калійно-фосфатному буфері (рН 7,5), згідно методики [60],

глюкозо-6-фосфатази (КФ 3.1.3.9) — за гідролізом глюкозо-6-фосфату в інкубаційній суміші, як описано в [26], **фруктозо-1,6-дифосфатази** (КФ 3.1.3.11) — за гідролізом фруктозо-1,6-дифосфату по [33].

Одержані результати оброблені статистично з використанням методів варіаційної статистики, дисперсійного та кореляційного аналізу [21].

У роботі використано біохімічні реактиви "LKB" (Швеція), "Reanal" (Угорщина), "Lachema" (Чехія), "Fecas" (Німеччина) та неорганічні солі "Рсахим" класифікації "хс" та "осс" в окремих випадках додатково перекристалізовані

Результати досліджень та їх обговорення

Енергетичний статус організму тварин як інтегральної термодинамічної системи забезпечується за рахунок тканинного та метаболічного розподілу, а також підтримання гомеостатичного співвідношення інтенсивності процесів утилізації, перерозподілу і синтезу основних резервних енергетичних компонентів клітин. Виходячи з цього, комплексність дослідження досягається вивченням основних найбільш метаболічно активних органів: печінки (функційна активність), м'язів (основне депо енергетичних резервів), зябер (основний орган вазмообміну з зовнішнім середовищем), мозку (витривалість і стабільність нервової системи визначає ефективність адаптації).

Крім того, оскільки активність ферментів дозволяє оцінювати лише стан окремих реакцій метаболічних ланцюгів, які каталізуються ними, а не про їх активність загалом, а за концентрацією метаболітів можна судити тільки про спрямованість обміну речовин, але не про його швидкість, то об'єктивність аналізу рівня біохімічної активності організму досягається одночасним дослідженням взаємопов'язаних показників динаміки і тканинної специфіки перерозподілу енергетичних субстратів, стану ферментних систем в окремих субклітинних структурах, швидкості перетворення потоку інтерметаболітів, а також внутрішньоклітинного перерозподілу регуляторних факторів, в першу чергу нікотинамідних коферментів

Особливості використання основних енергетичних субстратів

Оскільки будь-яка дегоксикація в організмі є енерговитратним процесом, виникає закономірне питання про те, що використовується на його забезпечення — найбільш енергетичні ресурси чи запасні речовини? Відомо, що рівень останніх у тварин є важливою формою акумуляції енергії. Їх динаміка у риб за дії аміаку різноманітна для різних класів речовин і має тканинну специфіку (табл. 1). В усіх досліджуваних тканинах не виявлено вірогідних змін вмісту білків. Це свідчить про те, що білки як джерело енергії використовуються незначно. Аналіз динаміки вільних АК в м'язах та печінці коропа за дії аміаку [10] дозволяє вважати, що за дії аміаку у коропа одночасно активуються і розщеплення, і синтез білків. Про це свідчить як зростання активності лізосомальних протеїназ у м'язах та печінці, так і активація біосинтетичних, наприклад, аміносинтезних реакцій [11]. При цьому зберігається постійний пул основних пезаміних АК. Отже, в організмі риб за рахунок адаптивної перебудови обміну білків, яка спрямована на знешкодження надлишку аміаку шляхом його зв'язування з утворенням амідних сіолук, витримується загальний азотистий гомеостаз. Підтвердженням цього є як нагромадження амідів та білків, так і значне зниження у вказаних умовах швидкості екскреції аміаку [16]. За інтоксикації організму риб аміаком частка білків як окиснюваного в енергетичних процесах субстрату, очевидно, незначна, а їх роль головно полягає у підтриманні азотистого гомеостазу та перебудові структурно-функціональних елементів клітин. Однак, можлива також участь амінокислот у забезпеченні організму необхідними у енергетичному обміні проміжними метаболічними субстратами, насамперед кетокислотами.

Відомо, що однією з найбільш зручних форм заощадження енергії в тілі риб є ліпіди, особливо ТАГ, які складають 75% всієї маси їх резервного жиру [67, 69]. Крім того, нейтральні жири відносно швидко обмінюються при мобілізації і ресинтезі і тому є зручною формою акумуляції жирових резервів риб [65]. Виявлена нами зміна вмісту і складу ліпідних фракцій у коропа за дії аміаку узгоджується з цими закономірностями. У піддослідних риб спостерігаються значні коливання рівня всіх фракцій ліпідів в печінці. Це проявляється у підвищенні вмісту сумарних ліпідів, ТАГ і ВЖК відповідно на 23,2%; 56,7 та 58,3%. Збільшення вмісту ВЖК відбувається також в крові риб ($P < 0,01$). У м'язах вірогідних змін цих показників не виявлено, але тенденція до їх збільшення також має місце. Вміст ліпідів у мозку не змінюється. У зв'язку з цим слід відзначити, що адаптивні реакції у риб є тканинноспецифічними.

**Динаміка вмісту основних енергетичних компонентів тканини коропа за дії
екзогенного аміаку, n=5**

Концентрація аміаку (мг/л)	Загальний білок (мг/г тканини)	Ліпіди (мг/г тканини)		ВЖК (мкмоль/г тканини)	Вуглеводи	
		загальні	ГАГ		глікоген (мг/г тканини)	глюкоза (мкмоль/г тканини)
БІЛІ М'ЯЗИ						
0,014 (контроль)	70,66±7,32	60,61±5,09	35,43±2,16	0,25±0,02	2,20±0,19	1,11±0,08
0,10	80,24±8,18	62,48±4,75	28,94±2,32	0,28±0,03	0,40±0,03*	1,05±0,08
ПЕЧІНКА						
0,014 (контроль)	138,56±9,24	71,51±6,73	32,15±2,49	0,41±0,04	17,23±0,98	7,98±0,62
0,10	124,40±8,62	98,13±8,09*	50,34±1,19*	0,65±0,06*	12,00±0,63*	15,76±1,49*
КРОВ						
0,014 (контроль)	52,03±3,58	72,36±4,25	-	0,67±0,06	-	1,41±0,16
0,10	56,17±3,92	67,95±4,05	-	1,44±0,12*	-	1,83±0,21
МОЗОК						
0,014 (контроль)	14,60±3,26	258,13±13,86	48,35±3,14	1,01±0,09	3,80±0,31	2,54±0,19
0,10	42,21±2,25	266,20±19,70	51,86±3,91	0,81±0,07	1,60±0,47	3,01±0,26

Відомо, що при температурних аклімаціях найбільш табільною тканиною щодо ліпидного обміну є печінка [27]. За даними цієї роботи в м'язах збільшення температури також не приводить до зміни вмісту ліпідів. Виявлена особливість мобілізації ліпідів, очевидно, є універсальною для будь-яких стресових станів і пояснюється різною функційною роллю печінки та м'язів риб [38].

Основною мішенню дії аміаку є фракція ГАГ в печінці і ВЖК в печінці та крові риб. Відомо, що рівень ВЖК в крові та печінці є критерієм фізіологічного стану організму і характеризує швидкість їх мобілізації із жирових депо. Так, відношення ІАГ/ВЖК відображає співвідношення інтенсивності процесів ліполізу і естерифікації. Оскільки цей коефіцієнт в печінці дослідних риб знижується (0,071 проти 0,078 у контролі), а рівень ВЖК і ІАГ збільшується, то можна передбачати зниження швидкості гідролізу ТАГ відносно стерифікації і порушення мобілізації жирних кислот з депо та їх транспорту до периферійних тканин і окиснення в АТФ. Одержані дані узгоджуються з уявленнями про показники стрес-реакції організму за дії несприятливих факторів середовища [32]. Згідно цих, збільшення вмісту ВЖК в крові і печінці тварин пов'язане не стільки з їх участю в процесах окиснення, скільки з взаємодією з клітинними мембранами для стабілізації структури останніх [64]. При цьому ВЖК зменшують проникність мембран. У випадку дії аміаку останнє є актуальним, оскільки може запобігати проникненню аміаку в організм риб. Збільшення вмісту ТАГ можливе в зв'язку з тим, що вони при розвитку стрес-реакції, яка викликає розщеплення фосфоліпідів, заступають останні у складі мембран [32].

Отже, для білків та ліпідів в умовах розвитку стрес-синдрому, викликаному аміаком, в першу чергу характерна участь не в енергозабезпеченні організму, а в перерозподілі структурних ресурсів у формі амінокислот, ВЖК і ТАГ та їх спрямування в адаптивні системи, які протидіють впливу стрес-факторів. Провідна роль в цьому, очевидно, належить печінці. Цей орган забезпечує за рахунок резервів глікогену і енергетичну адаптацію риб до аміаку.

Вміст глікогену в печінці за дії аміаку знижується на 29,4%. У м'язах при значно нижчому абсолютному рівні глікогену навіть у контролі його рівень у дослідних риб знижується у 5,5 рази порівняно з рибами контрольної групи. При цьому в печінці удачі збільшується вміст глюкози. У м'язах, крові та мозку риб її рівень не змінюється. Мобілізація

глікогенового резерву печінки і м'язів, гіперлікемія у печінці, збільшення вмісту ВЖК в організмі є показником активації окиснення глюкози в тканинах риб, переважно в процесах гліколізу та пентозофосфатного шляху [5, 32]. Про активне окиснення глюкози також свідчить підвищення коефіцієнту відношення ВЖК/глюкоза з 0,051 у печінці дослідних риб проти 0,044 у печінці контрольних особин. Аналогічний показник для мозку складає відповідно 0,40 і 0,27. Отже, в печінці та мозку риб частка глюкози в енергетичному забезпеченні за дії аміаку зростає. Оскільки у мозку рівень глікогену не змінюється, можна передбачити транспорт енергетичних субстратів в цей орган з печінки. Свідченням цього можна вважати сталість вмісту глюкози в крові риб. У м'язах, незважаючи на вичерпання запасів глікогену протягом 14 діб аклімації риб в воді з підвищеним рівнем аміаку, вміст глюкози також не змінюється. Витримування гомеостатичного рівня глюкози у організмі риб дає можливість передбачити активацію у печінці глюконсогенезу, в першу чергу, за рахунок ВЖК та АК, вміст яких, як зазначалося вище, за дії аміаку може збільшуватися за рахунок розщеплення білків та ТАГ. Наведені вище попередні висновки підтвердилися при дослідженні активності ферментів основних метаболічних шляхів енергоутворення та концентрації їх субстратів.

Функціонування основних систем утворення енергії

За дії аміаку водного середовища в концентрації 0,10 мг/л протягом 14 діб його вміст в тканинах риб збільшується (табл. 2). Найзначніші зміни спостерігаються в печінці і крові. В останньому випадку рівень аміаку у дослідних риб збільшується до $10,02 \pm 1,30$ нмоль/мг білку порівняно з контролем $6,01 \pm 0,81$ нмоль/мг білку ($P < 0,05$). Тому можна констатувати, що в організмі риб має місце стійка інтоксикація аміаком. З метою його детоксикації в м'язах та печінці коропа значно активується один із ферментів зв'язування аміаку NADP(H) — ГДГ [11]. Внаслідок цього в печінці вірогідно знижується вміст 2-оксиглутарату і, відповідно, збільшується у 4 рази рівень продукту реакції — глутамату. У м'язах вміст 2-оксиглутарату не змінюється, а глутамату зростає практично у 2,2 рази. Це призводить до зміни співвідношення в тканинах вказаних інтермедатів.

Таблиця 2

Вплив аміаку водного середовища (0,10 мг/л) на вміст субстратів NAD(P)-залежних деїдрогеназних систем в м'язах та печінці коропа (мкмоль/г тканини), n=8

Показники	Печінка		М'язи	
	0,015 мг NH ₃ /л	0,10 мг NH ₃ /л	0,015 мг NH ₃ /л	0,10 мг NH ₃ /л
Лактат	1,69±0,18	2,20±0,24	3,20±0,28	4,31±0,26*
Пироват ⁺	0,12±0,01	0,10±0,01	0,15±0,04	0,18±0,02
2-оксиглутарат	0,36±0,05	0,27±0,04	0,29±0,04	0,27±0,03
Малат	0,24±0,03	0,26±0,04	0,24±0,01	0,29±0,02*
Оксалоацетат	0,20±0,03	0,25±0,02	0,25±0,02	0,29±0,02
Цитрат	0,34±0,04	0,28±0,03	0,27±0,03	0,36±0,05
Глутамат	0,91±0,12	4,05±0,32*	1,69±0,14	4,12±0,30*
NH ₄ ⁺	4,80±0,41	5,60±0,48	3,58±0,25	6,15±0,36*

Примітка * — значення показника в мкмоль/100 г тканини, 0,015 мг NH₃/л — контроль

Однак повного знешкодження аміаку не відбувається. Тому має місце зміна вмісту субстратів енергетичних систем. Відомо, що аміак викликає залуження крові. При цьому активується утворення речовин, які підтримують кислотно-основну рівновагу. Ця функція у риб, як відмічається у [17, 57, 78], належить лактату. Іншою причиною переважно гліколітичного шляху окиснення вуглеводів у риб є утворення слизу на поверхні зябер при дії підвищених рівнів аміаку та зниження інтенсивності дихання і вмісту кисню в організмі риб [31, 61]. Тому, поряд із зменшенням в м'язах та печінці риб вмісту глікогену, в нашому

дослідженні виявлено зростання у м'язах рівня лактату. Це супроводжується також збільшенням активності ЛДГ (табл. 3). Однією із причин цього може бути як активне використання лактату на нейтралізацію аміаку, так і його перетворення в піруват, рівень якого в тканинах дослідних риб також високий. Крім того, можлива пряма активація ферментів гліколізу аміаком. Наприклад, відомо, що він активує фосфофруктокіназу та піруваткіназу [68]. Слід відмітити також посилення ролі гліколізу в цих умовах як шляху енергозабезпечення, оскільки аміак пригнічує функціонування більш ефективного шляху генерування енергії — ЦТК. Свідченням останнього є динаміка основних субстратів і ферментів цього циклу

Таблиця 3

Вплив аміаку водного середовища (0,10 мг/л) на активність деяких ферментів енергетичних систем у мітохондріях (м) та цитоплазмі (ц) клітин м'язів та печінки коропа, n=8

Активність	Фракція	Печінка		М'язи	
		0,015 мг NH ₃ /л	0,10 мг NH ₃ /л	0,015 мг NH ₃ /л	0,10 мг NH ₃ /л
Лактатдегідрогенази (нмоль NADH/(мг білка*хв))	ц	207,64±12,29	173,64±12,80	200,72±19,46	243,8±18,82
Сукцинатдегідрогенази (нмоль сукцинату/(мг білка*хв))	м	2,24±0,22	1,04±0,16*	7,49±0,03	1,72±0,18*
Малатдегідрогенази (нмоль NADH/(мг білка*хв))	ц	5,06±0,51	5,22±0,42	4,38±0,38	2,84±0,27*
	м	0,52±0,03	0,32±0,02*	0,37±0,05	0,27±0,04
Глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази (нмоль NADP/(мг білка*хв))	ц	51,44±4,95	66,87±5,13*	3,44±0,31	4,01±0,55
6-фосфоглюконат-дегідрогенази (нмоль NADP/(мг білка*хв))	ц	21,24±1,81	78,17±2,18*	4,52±0,39	5,12±0,18
Глюкозо-6-фосфатази (нмоль P _i /(мг білка*хв))	ц	160,43±10,91	98,12±10,07*	34,82±2,31	13,21±1,23*
	м	21,04±2,56	46,75±3,44*	не виявлено	не виявлено
Фруктозо-1,6-ди-фосфатази (нмоль P _i /(мг білка*хв))	ц	2,70±0,21	3,24±0,38	9,36±0,77	4,63±0,33*
	м	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено
Аланинамінотрансферази (нмоль пірувату/(мг білка*хв))	ц	181,39±15,12	262,10±14,40*	31,98±3,56	135,50±13,73*
	м	120,15±12,86	301,95±26,45*	65,92±7,40	103,53±9,80*

Примітка 0,015 мг NH₃/л — контроль

За дії аміаку виявлено значне зниження (у 2 рази в печінці та у 3,5 в м'язах) активності основного регуляторного ферменту циклу Кребса — сукцинатдегідрогенази. Відомо, що зовнішнє середовище у пойкилотермних організмів в обмеженні швидкості метаболізму відіграє суттєву роль, ніж у ссавців [40]. У цьому контексті сукцинатдегідрогеназа є одним з найбільш чутливих ферментів, що підтвердилося і в нашому дослідженні. Крім того, даний фермент на відміну від NAD(H)-залежних дегідрогеназ циклу регулюється низкою внутрішньоклітинних факторів, включно рівнем внутрішньомітохондрійного АТФ та іонів кальцію [75]. Враховуючи активацію гліколізу та зниження вмісту АТФ за дії аміаку [51], а також стимулювання ним виходу кальцію із організму риб [7], можна передбачити функціонування цих механізмів опосередкованого впливу аміаку на активність СДГ і ЦТК відповідно. Крім того, нами виявлено зниження вмісту одного з інтермедіатів циклу 2-оксиглутарату. Оскільки це узгоджується з зростанням активності NADP(H)-ГДГ [11] та нагромадженням глутамату [10], можливе витучення 2-оксиглутарату з пулу інтермедіатів ЦТК, що може бути ще однією причиною зниження його активності. Раніше такий механізм гальмування ЦТК у риб при зимовому голодуванні виявлено у мозку коропа [34].

Щодо вмісту інших субстратів ЦТК малату, оксалоацетату та цитрату, то їх рівень у дослідних риб порівняно з контрольними практично не змінюється, крім вмісту малату в

м'язах. Однак, активність малатдегідрогенази у мітохондріях знижується. Це також підтверджує гальмівний ефект аміаку щодо ЦТК і узгоджується з даними роботи [74]. Додатковим фактором зниження аеробного шляху окиснення може бути дія ВЖК, які, як відомо, ініціюють роз'єднання окиснення та фосфорилування. Крім того, зниження синтезу АТР цим шляхом можливо завдяки використанню відновлених еквівалентів NAD(P)H на інші цілі, насамперед, на зв'язування аміаку у NADP(H) — ГДГ реакції.

Про активне генерування саме відновлених форм NADPH свідчить висока активність NADPH — генеруючих ферментів. У печінці хребтних необхідний пул NADPH підтримується першими двома ферментами пентозофосфатного шляху глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназою і 6-фосфоглюконатдегідрогеназою, а також NADP(H) — малатдегідрогеназою цитоплазми. Показана роль цих ферментів в генеруванні NADPH та ліпогенезі при температурній аклімації риб [41]. За дії аміаку водного середовища виявлено збільшення активності Г-6-ФДГ та 6-ФДГ. Роль малатдегідрогенази у даному процесі, очевидно, незначна, бо рівень її активності за дії аміаку не змінюється. Зростання утворення відновленої форми NADPH можна пояснити не тільки його участю як коферменту амонійзв'язуючої ГДГ, але і використанням у ліпогенезі. Це узгоджується з даними про зростання за дії аміаку вмісту в тканинах риб ТАГ.

У зв'язку з високою інтенсивністю ліпогенезу, синтезом для цього NADPH пентозофосфатним шляхом у дослідних риб виникає необхідність підтримання високих рівнів глюкози. Однак, інтенсивне функціонування гліколізу та дії аміаку також вимагає значної кількості цього субстрату. Тому може виникати конкуренція за глюкозу між гліколізом і ПФШ. У зв'язку з цим рівень глюкози і в м'язах, і в печінці повинен підтримуватися за рахунок певних джерел. Оскільки запаси глікогену протягом 14 діб аклімації риб значно знижуються, але рівень глюкози при цьому у дослідних риб порівняно з контрольними не змінюється, а у печінці навіть зростає, то слід припустити відновлення рівня глюкози за рахунок глюконеогенезу в печінці. Імовірність активації даного шляху обміну вуглеводів за дії аміаку висока, оскільки не виявлено зниження рівня пірувату що свідчить про зменшення активності ЦТК про зниження його окиснення аеробним шляхом. До аналогічного висновку приводить також аналіз співвідношення вмісту лактату у риб дослідної та контрольної груп. Як відомо у риб субстратом а глюконеогенезі переважно використовується саме лактат [28]. Його вміст у м'язах, де найбільш активно у риб функціонує гліколіз, за дії аміаку значно збільшується. Однак у печінці його рівень у контрольних і дослідних риб вірогідно не відрізняється. Це дозволяє вважати можливим використання обох кінцевих продуктів гліколізу в м'язах як субстратів глюконеогенезу у печінці. Крім того, на користь функціонування глюконеогенезу свідчить постійний рівень глюкози в крові риб. Є дані, що в стресових умовах, наприклад, при довготривалому голодуванні під час нерестової міграції, глюконеогенез у риб може протікати з утворенням надлишку глюкози і навіть її запасанням у вигляді глікогену [56]. При цьому джерелом для синтезу глюкози виступають амінокислоти. У випадку дії аміаку роль останніх у глюконеогенезі також не можна відкидати, оскільки в цих умовах у м'язах та печінці спостерігається зниження рівня саме так званих глюкогенних АК, а також активується NAD(H)-ГДГ, яка здійснює їх дезамінування з утворенням відповідних кетокислот. Прямим доказом активації глюконеогенезу є підвищення рівня активності ферментів цього метаболічного ланцюга Ф-1,6-ДФ-ази та Г-6-Ф-ази. Остання забезпечує гідроліз глюкозо-6-фосфату до глюкози в глюконеогенезі та бере участь у глюкокіназній реакції гліколізу. Активність Ф-1,6-ДФ-ази за дії аміаку значно знижується в м'язах і одночасно зростає в печінці, що узгоджується з зростанням інтенсивності біосинтезу глюкози в цьому органі. Наявність Ф-1,6-ДФ-ази у м'язах риб пов'язана з функціонуванням в них субстратного циклу між фруктозо-6-фосфатом і фруктозо-1,6-дифосфатом, який одержав назву "марніотратного" циклу, бо, виконуючи роль неспецифічної АТРази, приводить до енергетичних витрат. Однак, останнє компенсується збільшенням ефективності контролю швидкості метаболічного потоку [35]. Роль циклу між Ф-6-Ф і Ф-1,6-ДФ зводиться до підвищення контролю швидкості гліколізу. За дії аміаку в умовах забезпечення енергією переважно гліколітичним шляхом, необхідність такого контролю, очевидно, знижується. Тому активність Ф-1,6-ДФ-ази у м'язах також зменшується. Щодо Г-6-Ф-ази, то її субклітинна локалізація виключає можливість

змішування вказаних вище функцій гліколізу та глюконеогенезу [35]. Г-6-Ф, який утворюється у глікокіназній реакції, ніколи не використовується як субстрат Г-6-Ф-ази глюконеогенезу, а продукти цієї реакції, яка є фосфатазна, глюкоза, вивільняється в кров і не може бути субстратом глікокіназного перетворення. Для коропа констатується цитоплазматична локалізація Ф-1,6-ДФ-ази і Г-6-Ф-ази глюконеогенезу [12, 28]. Згідно наших даних у м'язах фосфатазна активність знижується, що також узгоджується з посиленням в них за дії аміаку гліколізу та відсутністю глюконеогенезу. У мітохондріях печінки активність Г-6-Ф-ази за дії аміаку зростає. Крім того, хоча активація глікокіназної реакції ферменту також значно збільшується, підтверджуючи посилення глікогенолізу в цьому органі, 1-6-Ф-азна активність вища, ніж глікокіназна майже у 5 разів. Це дає можливість загалом констатувати факт активного функціонування глюконеогенезу в печінці коропа за дії аміаку.

Відомо, що одночасно з глюконеогенезом за умови його активування, в організмі тварин функціонує спряжений з ним глюкозо-аланіновий цикл [43]. Останній активується, зокрема, при інтенсивному утворенні аміаку у м'язах ссавців у результаті м'язової діяльності [22, 43]. Суть цього циклу полягає в утворенні у м'язах за рахунок гліколітичного окиснення вуглеводів пірувату, який замість подальшого перетворення у лактат трансамінується з глутаматом аланіновою трансферазою в аланін, потім останній транспортується кров'ю в печінку і знову перетворюється в піруват шляхом переамінування з 2-оксиглутаратом з наступним синтезом глутамату. Фізіолого-біохімічне значення цього циклу полягає у видаленні із м'язів високотоксичного аміаку у вигляді аланіну в печінку з наступним виведенням з організму в уреотелічних тварин через оригіновий цикл синтезу сечовини, а у амоніотелічних через глутамат і глутамін з участю NADP(H)-ГДГ та ГС відповідно. Вибір аланіну як транспортної форми аміаку пояснюється його низькою токсичністю та здатністю, на відміну від глутамату, до легкого проникнення через мембрани. Глюконеогенез при цьому забезпечує метаболічну рівновагу по глікозі, її гомеостаз у крові та енергетичний баланс. Отже, збільшення вмісту аміаку, глутамату та глутаміну у м'язах повинно приводити до активування розглянутих процесів. Глутамат і глутамін є ефективними субстратними активаторами глюкозо-аланінового циклу [15, 43].

Оскільки нами виявлено зростання рівня вказаних метаболітів в м'язах риб за дії аміаку, то можна передбачити імовірність функціонування циклу і в даних умовах. Про це свідчить також підвищення активності NADP(H)-ГДГ у м'язах риб, яка забезпечує достатню кількість глутамату для АЛАТ реакції. Інший субстрат — піруват — утворюється в активному в цих умовах гліколізі. Про використання пірувату на переамінування в аланін свідчить той факт, що відношення показника його рівня у м'язах до аналогічного показника у печінці контрольних риб становить біля одиниці, а відношення значення показника концентрації пірувату в м'язах до його значення в печінці дослідних риб становить 1,3. Тобто, рівень пірувату у печінці риб дослідної групи порівняно з м'язами, на відміну від контрольних риб, вищий. Враховуючи, що переважна більшість кінцевих продуктів гліколізу знаходиться у формі лактату, необхідного для нейтралізації аміаку, та наведені факти динаміки співвідношення вмісту пірувату у м'язах дослідних риб, слід зазначити вищу швидкість утворення пірувату, ніж його перетворення у лактат, та підтримання його постійної концентрації у м'язах. Це може свідчити про використання пірувату в процесах переамінування, оскільки його окиснення внаслідок зниження активності ЦГК також зменшується. Отже, у м'язах риб забезпечується достатня кількість субстратів для переамінування. Трансамінування в АЛАТ-реакції за дії аміаку активується як у м'язах, так і в печінці [29]. Збільшення поряд з цим вмісту аланіну у м'язах та печінці дослідних риб [10], а також у їх крові з $0,46 \pm 0,09$ мкмоль/мл у контрольних риб до $1,18 \pm 0,11$ мкмоль/мл у дослідних ($P < 0,01$), також дозволяє констатувати функціонування аланінового шляху видалення аміаку з м'язів.

Отже, за дії аміаку з метою його детоксикації та виведення можливе функціонування об'єднаної системи обміну: глюконеогенез — глюкозоаланіновий цикл. Крім цього, функційне значення системи полягає у підтриманні рівноважної концентрації глюкози та інших інтермедіатів вуглеводного обміну, а також забезпеченні енергетичного та кислотно-основного

гомеостазу. Виявлені закономірності підтверджуються аналізом співвідношення нікотинамідних коферментів.

Вплив аміаку на співвідношення нікотинамідних коферментів

Нікотинамідні коферменти відносяться до регуляторних факторів, співвідношення окиснених та відновлених форм яких в певних субклітинних структурах є засобом зміни інтенсивності та спрямованості окремих ланцюгів вуглеводного, ліпідного, білкового та енергетичного обмінів. Одночасно дані співвідношення є наслідком окиснювально-відновного стану окремих дегідрогеназних ферментних реакцій та динаміки їх субстратів.

За дії аміаку у риб виявлено зростання в їх печінці та м'язах відношення лактат/піруват з 14 до 23 та з 11 до 24 відповідно (табл. 2) Це свідчить про зростання відновленості NAD-пар в цитоплазмі клітин. Відповідно в цитоплазмі клітин в обох тканинах знижується відношення NAD⁺/NADH (табл.4)

Таблиця 4

Вплив аміаку водного середовища (0,10 мг/л) на окисно-відновний стан NAD(P)-пар в цитоплазмі (ц) і мітохондріях (м) тканин коропа

Показники	Печінка		М'язи	
	0,015 мг NH ₃ /л	0,10 мг NH ₃ /л	0,015 мг NH ₃ /л	0,10 мг NH ₃ /л
NAD/NADH ц	788,95	489,90	520,83	464,03
NADP/NADPH ц	0,0065	0,0049	0,0082	0,0081
NAD/NADH м	4,90	0,97	15,73	10,83
NADP/NADPH м	7,63	14,49	24,52	16,76

Примітка 0,015 мг NH₃/л – контроль

У м'язах ця зміна пов'язана з нагромадженням лактату. У печінці це є показником зниження швидкості окиснення глюкози в цитоплазмі та активації гліколізу, що узгоджується з наведеними вище даними. У мітохондріях м'язів та, особливо, печінки показник даного відношення знижується. Вище зазначалося, що у глутаматдегідрогеназній системі за дії аміаку відношення 2-оксиглутарат/глутамат також зменшується в обох органах. Цей ефект, а також нагромадження глутамату, сприяє переважанню NAD⁺ в мітохондріях. Це узгоджується з даними про використання 2-оксиглутарату в реакціях амінування з метою детоксикації аміаку та літературними даними про роль глутамату в окиснювальному фосфорилуванні [51]

Крім того, в м'язах риб виявлено вірогідне збільшення вмісту малату, а в печінці тенденцію до його нагромадження. Це також свідчить на користь зростання у мітохондріях цих тканин відновленої форми NAD.

За дії аміаку також змінюється відношення NADP⁺/NADPH. У цитоплазмі печінки воно зменшується на 25%, а в цитоплазмі м'язових клітин практично не змінюється. У мітохондріях печінки цей показник збільшується в 2 рази, а в мітохондріях м'язів, навпаки, зменшується на третину. Різномарактерні зміни даного показника пояснюються тканинною та субклітинною специфікою процесів, які протікають в організмі риб за інтоксикації аміаком. Висока відновленість NADP-пар цитоплазми узгоджується з низьким вмістом пірувату у печінці дослідних риб і тенденцією до зростання в ній рівню малату, а також збільшенням активності в цитоплазмі клітин цього органу малатдегідрогенази. Одночасно збільшення показника відношення NADP⁺/NADPH в мітохондріях є свідченням інтенсивного використання відновленої форми в процесах біосинтезу липідів, про зростання активності якого свідчить збільшення активності NADPH-генеруючих дегідрогеназ пентозофосфатного шляху у цитоплазмі печінки. Останнє також є причиною зменшення даного показника в цитоплазматичній фракції печінки дослідних риб. У цитоплазмі м'язів дія аміаку не призводить до зміни активності відповідних ферментів пентозофосфатного шляху. Тому, відношення NADP⁺/NADPH не змінюється. У мітохондріях м'язів зростає рівень NADP⁺. Це узгоджується із збільшенням ролі NADP(H)-ГДГ в процесах детоксикації аміаку в цій тканині у дослідних риб.

Крім того, зміна відношення NADP⁺/NADPH у мітохондріях може також регулювати електрохімічний потенціал на мембранах мітохондрій [6], який, в свою чергу, контролює

трансмембранні процеси Різкі, протилежно спрямовані зміни відношення $NADP^+/NADPH$ у мітохондріях печінки та м'язів риб за інтоксикації аміаком свідчать про порушення транспорту метаболітів через мітохондрійні мембрани

Редокс-стан $NAD(P)$ -пар регулюється фосфорилуванням аденіннуклеотидної системи [73] Тому, у зв'язку з розглянутими вище особливостями змін основних енергетичних циклів у організмі риб за дії аміаку є потреба аналізу її стану.

Вплив аміаку на вміст аденілових нуклеотидів

За дії аміаку водного середовища в умовах інгібування в організмі риб ЦТК та пріоритетного енергозабезпечення за рахунок гліколізу, а також використання АТФ у процесах детоксикації, насамперед, в глутамінсинтезній реакції, виявлено зниження вмісту АТФ практично в усіх органах риб, крім мозку (табл 5) Це узгоджується з даними роботи [74].

Таблиця 5

Вплив аміаку водного середовища (0,10 мг/л) на вміст аденозинфосфатів та енергетичний заряд в тканинах коропа (мкмоль/г сухої тканини), n=7-9

Показники	Печінка		М'язи		Мозок		Зябри	
	к	д	к	д	к	д	к	д
АТФ	4,99±0,34	2,80±0,21*	2,54±0,19	1,38±0,19*	0,24±0,04	0,21±0,05	1,41±0,13	1,06±0,09*
ADP	1,78±0,12	1,31±0,15	2,48±0,26	2,09±0,30	0,51±0,07	0,34±0,05*	0,94±0,08	0,83±0,07
AMP	0,62±0,08	0,79±0,06	2,39±0,24	1,52±0,30*	0,34±0,06	0,27±0,03	0,66±0,06	0,51±0,04*
Сума	7,39±0,58	3,93±0,14*	7,41±0,43	4,89±0,26*	1,12±0,06	0,82±0,04*	3,01±0,09	2,00±0,07*
P_i	5,81±0,28	5,63±0,32	13,11±0,64	10,81±0,99	5,71±0,54	6,31±0,45	9,84±0,67	9,24±0,52
АЕЗ	0,79	0,62	0,51	0,48	0,47	0,46	0,62	0,61
АТФ' ADP+P _i	0,47	0,38	0,12	0,06	0,09	0,10	0,11	0,13

Примітка к - контроль — 0,015 мг NH_3/l ; д - дослід — 0,10 мг NH_3/l

Спостерігається також тенденція до зниження вмісту ADP та AMP Відмічені зміни корелюють із зменшенням суми аденіннуклеотидів в усіх тканинах Це свідчить про зниження енергетичної ємності їх клітин Іншим підтвердженням такого висновку є вірогідне зниження потенціалу фосфорилування, який є термодинамічним показником і відображає здатність клітин до синтезу АТФ Зменшення потенціалу фосфорилування, а також зниження вмісту неорганічного фосфату свідчить про порушення цієї функції у риб за інтоксикації аміаком

Енергетичний заряд, на відміну від потенціалу фосфорилування, відображає кількість макроергічних зв'язків АТФ і ADP у загальному клітинному фонді аденіннуклеотидів Зменшення його значення, особливо в печінці та м'язах, корелює з пригніченням синтезу АТФ Отже, аміак інгібує процеси фосфорилування у аденіновій системі, що узгоджується з виявленим інгібуванням за його хронічної дії АТФ-залежних систем детоксикації.

Щодо окремих тканин, то найбільше знижується енергетичний статус м'язів і печінки. Це корелює з даними про глибоку перебудову обміну речовин за дії аміаку саме в цих органах.

Зменшення енергопродукування у зябрах можна пояснити порушенням у них аміаком процесів іонного обміну та поглинання кисню, про що зазначалося раніше. Можливо, високий рівень енерговитрат у зябрах є наслідком формування специфічних захисних систем, функціонування яких спрямоване на протидію проникненню аміаку в організм риб

Найменші зміни показників, які розглядаються, відмічено у мозку дослідних риб, хоча виявлено зменшення у цьому органі вмісту ADP та суми аденілових нуклеотидів. Підтримання аденілатного енергетичного заряду та потенціалу фосфорилування, що узгоджується з збереженням рівня неорганічного фосфору, свідчить про можливість функціонування у мозку захисних механізмів стабілізації енергетичного живлення Цей висновок узгоджується з думкою про формування при стресах у тварин так званого "гематоенцефалічного бар'єру захисту", функціонування якого спрямоване на запобігання пошкодженням мозку за

несприятливої дії на організм [24, 32]. Раніше показано, що однією з найважливіших складових такої системи у риб є зміцнювання абіотичними факторами середовища синтезу у печінці риб додаткових субстратів для енергетичного окиснення у мозку кетонових тіл [12, 13].

Особливості обміну кетонових тіл у риб за дії аміаку

Відомо, що кетоніві тіла за розвитку в організмі тварин енергодефіцитного стану можуть використовуватися як додатковий субстрат окиснення та енергетичного живлення периферійних тканин, а також бути регуляторами окремих ланок метаболізму [89]. Кетогенез, як правило, протікає у печінці при умові зниження рівня глюкози в організмі або її недоступності для аеробного окиснення у зв'язку з виконанням інших функцій, чи за умови пригнічення ЦГК. За дії аміаку у коропа, як зазначалося вище, мають місце обидва явища. По-перше, запаси глюкози у вигляді глікогену швидко та помітно знижуються; по-друге, її утворення у глікогеногенезі, хоча і забезпечують гомеостатичний рівень у крові, мабуть, не сприяє окисненню, а пріоритетно забезпечує функціонування глюкозо-аланінового циклу та продукування необхідних для детоксикації аміаку кіншєвих продуктів гліколізу — пірувату і лактату. Взагалі, існує думка, що роль гліколізу у печінці риб полягає не стільки в енергозабезпеченні в їх організмі, скільки в постачанні попередників у біосинтетичні процеси [88]. За інгібування аміаком ЦГК можливе використання пірувату для синтезу кетонових тіл $2 \text{ піруват} \rightarrow 2 \text{ ацетил-CoA} \rightarrow \text{ацетоацетил-CoA} \rightarrow \text{ацетоацетат} \rightarrow 3\text{-оксибутират}$.

Доказом функціонування даного процесу є збільшення вмісту у деяких тканинах дослідних риб вмісту кетонових тіл (рис.1,а) та зростання активності одного з основних ферментів енергетичної утилізації кетонових тіл 3-оксибутиратдегідрогенази (рис.1,б).

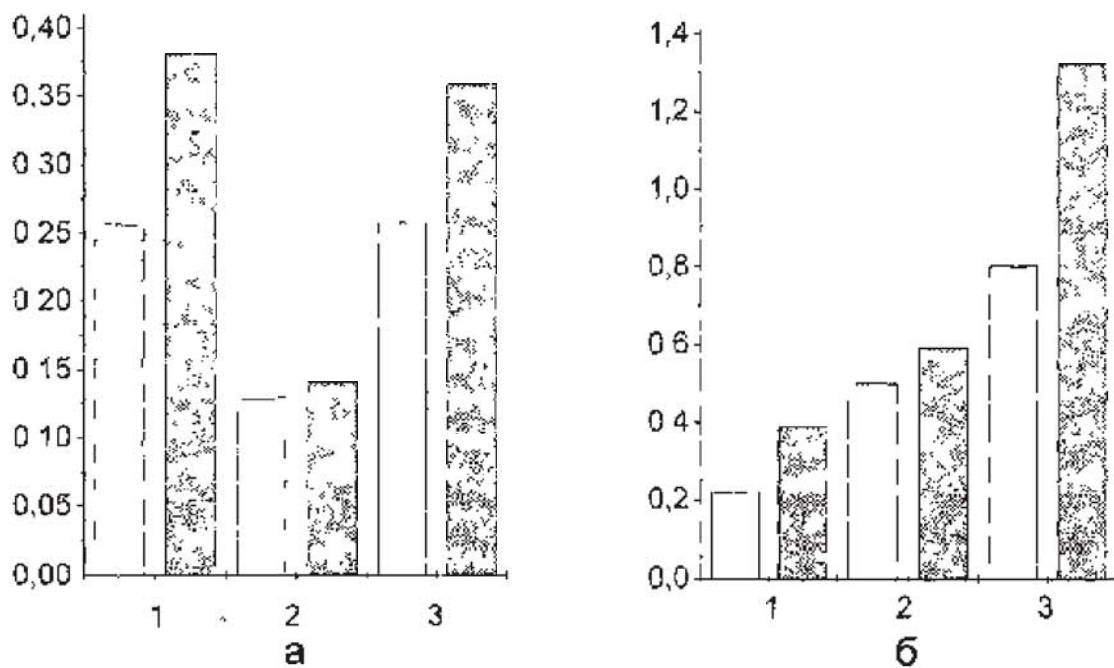


Рис. 1. Вплив аміаку (0,10 мг/л) на вміст кетонових тіл (а) та 3-оксибутиратдегідрогеназну активність (б) у м'язах (1), печінці (2) та мозку(3) коропа. Г — контроль, — дослід.

Одержані дані свідчать про те, що найвищим вміст 3-оксибутирату є у мозку риб, а ацетону та ацетоацетату — у м'язах та мозку. Згідно з літературними даними синтез кетонових тіл відбувається у печінці [22]. Однак, в цьому органі суттєвих відмінностей вмісту кетонових тіл контрольних і дослідних риб не виявлено. Це узгоджується з низькою 3 — оксибутиратдегідрогеназною активністю в цьому органі порівняно з іншими. Передбачаємо швидке видалення утворених у печінці кетонових тіл і їх постачання периферійним тканинам, які страждають від зниження енергозабезпечення організму першими. Це підтверджується тим, що у м'язах риб дослідної групи, на відміну від печінки, вміст ацетоацетату та ацетону на 20%

більший, ніж в м'язах контрольних риб. Цей показник для 3-оксибутирату складає 32%. У мозку кількість кетонівих тіл у дослідних риб на 30 і 39% відповідно вищій, ніж у контрольних риб. Значно вища 3-оксибутиратдегідрогеназна активність у мозку і м'язах риб порівняно з печінкою, а також збільшення її рівня в цих тканинах майже на 50% за дії аміаку, є свідченням інтенсивного використання кетонівих тіл в цих тканинах при інтоксикації організму аміаком. Підвищення ролі кетонівих тіл в енергозабезпеченні у риб за дії аміаку може бути пов'язане з використанням глюкози для підтримання функціонування систем його детоксикації та зниження енергозабезпечення за рахунок традиційних шляхів окиснення. Висока імовірність синтезу кетонівих тіл підтверджується також високим вмістом та резорбцією за дії аміаку вільних амінокислот та ВЖК, які є основними субстратами для синтезу кетонівих тіл.

Отже, утворення кетонівих тіл можна вважати одним із компенсаторних механізмів енергозабезпечення за несприятливої дії аміаку. Одночасно слід відмітити, що рівень кетонівих тіл визначається співвідношенням процесів їх синтезу та окиснення. Оскільки 3-оксибутиратдегідрогеназна активність у печінці дослідних риб порівняно з контрольними не змінюється, то в цьому органі їх утилізація не відбувається. Тому виникає певний дисбаланс між синтезом кетонівих тіл у печінці і їх використанням в інших органах. Це може викликати інтоксикацію організму кетонівими тілами та бути додатковим несприятливим фактором у організмі риб при отруєнні аміаком.

Отже, процеси окиснення в організмі риб за дії граничних рівнів аміаку водного середовища забезпечують енерговитрати на адаптацію інших систем обміну речовин, беруть участь у підтриманні метаболічного та кислотно-основного гомеостазу в організмі. Вказані зміни спрямовані на запобігання розвитку патологій та підтримання гомеостазу фізіологічних функцій організму, а також на забезпечення функційної адаптації клітин, тканин і органів у несприятливих умовах за дії аміаку.

Висновки

1. Встановлено, що надлишок аміаку у водному середовищі та організмі риб змінює спрямованість та швидкість перетворення вуглеводів у ключових ланках їх метаболізму.

2. Досліджено механізми пошкоджуючої дії аміаку у системах енергозабезпечення, які потягають у:

— вибіркового виділення із метаболічних ланцюгів окремих проміжних метаболітів (наприклад, лактату та 2-оксиглутарату), які використовуються у процесах детоксикації та для підтримання кислотно-основного і метаболічного гомеостазу: активації ферментів та ферментних систем, пов'язаних з детоксикацією аміаку;

— збільшенні енерговитрат, спрямованих на підтримання енергозабезпечення систем детоксикації;

— зниженні активності аеробних ланок енергозабезпечення та посиленні функціонування гліколізу;

— зміні співвідношення регуляторних факторів енергетичного обміну, що проявляється у збільшенні загального вмісту відновлених форм нікотинамідних коферментів, що в свою чергу приводить до зміни складу та перерозподілу основних енергетичних компонентів тканин;

— встановленні специфічного співвідношення інтенсивності окремих ланок метаболізму вуглеводів, який полягає в активуванні гліколізу у м'язах та гліоконеогенезу у печінці з одночасним функціонуванням глюкозоаланінового циклу;

— зниженні стану фосфорилування аденіннуклеотидної системи та активуванні за цих умов додаткової системи енергозабезпечення шляхом синтезу кетонівих тіл.

3. Більшість виявлених закономірностей має місце за дії на риб інших токсикантів (ДДТ, солей важких металів, токсинів синьо-зелених водоростей, СПАР і ін.) [29]. Тому, можна зробити висновок, що в організмі риб у відповідь на інтоксикацію формується своєрідний стан систем енергозабезпечення. Частину біохімічних змін, які відбуваються, можна вважати адаптивними, оскільки вони забезпечують виживання гідробіонтів при хронічній дії порогових рівнів токсикантів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Асатгани В.С. Определение гликогена по Зейфтеру / Биохимическая фотометрия М.: Изд-во АН СССР 1957 - С 452-453
2. Баев В.И., Булах Е.И. Способ определения кетонových тел в тканях / Мат. IV конф. и выступл. по изобр. и рационал. в медицине. — Л. Медицина, 1973 — С 89-90
3. Бейли Д. Методы химии белков — М. Мир 1965 — 216 с
4. Великий И.И., Пархомец П.К. Роль окислительно-восстановительного состояния никотинамидных коферментов в регуляции клеточного метаболизма // Витамины — 1976 — №9. — С 3-15
5. Весельский С.П. Влияние минерального обогащения комбикорма на рост и некоторые метаболические процессы в организме карпа при его садковом выращивании на подогретых водах // Автореф. дисс. канд. биол. наук 03.00.18 Институт гидробиологии АН УССР. — Киев, 1980 — 23 с
6. Винников А.И. Образование разности электрических потенциалов в мембранных везикулах *Staphylococcus aureus* // Биохимия — 1984. — Т. 49, № 12 — С. 2041-2044
7. Виноградов Г.А. Процессы почной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных // Физиология, биохимия и токсикология пресноводных животных Тр. ИБВВ — Л. Наука, 1990 — Вып. 57(60). — С. 3-28
8. Виноградова И.Л., Багрянцева С.Ю., Дервиз Т.В. Метод одновременного определения 2,3-ДФГ и АГР в эритроцитах // Лаб. дело - 1980 -- № 7. — С 424-426
9. Грубинко В.В. Механизм выведения аммиака у карпа, роль в нем глутаминсинтетазы и ее свойства // Автореф. дисс. канд. биол. наук 03.00.04 МГПИ им. В.И. Ленина — М. 1988 — 17 с
10. Грубинко В.В., Явоненко О.Ф., Арсан О.М. Механизм связывания экзогенного аммиака у карпа // Доповіді АН України -- Сер. б. — 1990 — № 5. — С 70-72
11. Грубинко В.В., Арсан О.М. Динаміка амінокислот і амідів у прісноводних риб при дії аміаку // Доповіді АН України — 1991 — № 3 -- С 142-145
12. Жиденко А.А. Особенности метаболизма энергетических компонентов у зимующей карпа и роль адаптивных меланинмов в ее выживаемости // Автореф. дисс. канд. биол. наук 03.00.04 Институт биохимии АН Украины им. А.В. Палладина — Киев, 1990. — 18 с
13. Жиденко А.А., Грубинко В.В., Явоненко А.Ф. Роль кетонových тел в энергетическом обеспечении пойкилотермных организмов в условиях зимнего голодания // Укр. биохим. журн. -- 1990 -- Т. 62, № 5 С 72-75.
14. Зинин В.П. Метод измерения 2-оксиглутаратдегидроксиазной активности интактных митохондрий // Укр. биохим. журн. — 1986 -- Т. 58, № 2 — С 73-77
15. Кендыш И.Н. Регуляция углеводного обмена — М. Медицина, 1985 — 271 с.
16. Коваленко В.Ф., Коцарь Н.И. Влияние собственных экзаметаболитов на газообмен у карпа при различных температурных условиях // Гидробиол. журн. 1991 -- Т. 27, № 2. — С 72-75
17. Козлов В.И., Абрамович Л.С. Справочник рыбовода. — М. Россельхозиздат, 1980 — 220 с
18. Кондратьева М.П., Лесникова М.Н., Шпоть С.Э. Метод определения неорганического фосфора по спектрам поглощения молибдатных комплексов в УФ // Биохимия — 1965 — Т. 30, № 3 — С 567-572
19. Коновалов Ю.Д. Связывание кадмия и ртути белками и низкомолекулярными тиоловыми соединениями рыб // Гидробиол. журн. 1993 - Т. 29, №1. С. 42-51
20. Коун К., Сарджент Дж. Питание, биоэнергетика и рост рыб — М. Мир, 1983 — С. 8-69
21. Лакля Г.Ф. Биометрия — М.: Высшая школа, 1990. — 351 с
22. Ленинджер А. Основы биохимии. — М.: Мир, 1985. - Т. 2 — 368 с.
23. Лувьяненко В.И. Общая ихтиотоксикология — М.: Легк. и прил. пром-сть, 1983 — 320 с
24. Лукьяненко В.И. Физиолого-биохимические аспекты экологического мониторинга / II Всес. конф. по рыбохоз. токс., С — Пб, ноябрь 1991. Тез. докл. — С. Пб. Би, 1991 — С 18-20
25. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. М. Химия, 1984 — 448 с
26. Львова С.П. Фосфорилазная и глюкозо-6-фосфатная активность в тканях крыс в онтогенезе // Укр. биохим. журн. - 1985 — Т. 57, № 1. С. 36-41.
27. Малиновская М.В. Особенности липидного и углеводного обмена у карпа при температурной акклимации // Автореф. дисс. канд. биол. наук 03-00-18 Институт гидробиологии АН Украины — Киев 1988 — 17 с
28. Малиновская М.В. Пути метаболизма углеводов у рыб и их температурная адаптация (обзор) // Гидробиол. журн. -- 1988 — Т. 24, № 6 — С 29-39
29. Маларевская А.Я. Обмен веществ у рыб в условиях антропогенного евтрофирования водоемов. — К.: Наук. думка, 1979 — 254 с

30. Мальяревская А.Я. Биохимические механизмы адаптации гидробионтов к токсическим веществам (обзор) // 1 гидробиол журн. - 1985 - Т 21, № 3 - С. 70-82
31. Матей В.Е. Функциональная морфология жаберного эпителия пресноводных костистых рыб // Физиология, биохимия и токсикология пресноводных животных. Тр. ИБВВ. Л. Наука, 1990 - Вып 57(60). - С. 104-141
32. Меерсон Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика - М., Наука, 1981 - 277 с
33. Определение активности сукцинатдегидрогеназы. Определение активности фруктозо-1,6-дифосфатазы // Современные методы в биохимии / Под. ред. В.П. Ореховича. М. Медицина, 1977 - С 44; 77-78
34. Мендлер Д. Биохимия - М.: Мир 1980 - 11 - 467 с
35. Ньюсхолм Э., Стар К. Регуляция метаболизма. - М. Мир, 1977 - 407с.
36. Парк Д.В. Биохимия чужеродных соединений. - М., Медицина, 1973. - 288 с
37. Прохорова М.Ю., Тиунов М.П., Шапалис Д.А. Простой колориметрический метод определения свободных жирных кислот // Лаб дело - 1977 - № 9 - С 535-536
38. Романенко В.Д. Эколого-физиологические основы тепловодного рыбоводства К. Наук думка, 1983 - 140 с.
39. Ромащенко В.Д., Гвгушецко П.Ю., Кошарь И.И. Метаболизм углекислоты у водных животных - К. Наук думка, 1980 - 180 с
40. Савина М.В. Механизмы адаптации тканевого дыхания в эволюции позвоночных - С.-Пб Наука, 1992 - 197 с.
41. Саутин Ю.Ю., Малиновская М.В. Влияние температурной акклимации на NADP-зависимую дегидрогеназную активность печени карпа и некоторые механизмы ее регуляции // Укр биохим журн 1988. Т 60, № 6 - С 29-34
42. Силкина Н.И., Виноградов I.А., Микряков В.Р. Состав липидов тканей карпа в условиях влияния ионов аммония / V Всес конф по водной токсикол Одесса, апр 1988. Тез докл - М.: Би - 1988 - С 144-145
43. Смирнов А.В. Роль глюконеогенеза при физической деятельности // Успехи совр. биологии. - 1984 Т 97, № 3. - С 399 - 412.
44. Струбицкая I.В. Гидрофобные ксенобиотики прудов и участие гепатопанкреаса карповых рыб в их метаболизме // Автореф дисс. канд биол наук 03-00-18 Институт гидробиологии АН Украины Киев 1990 - 16 с.
45. Технология производства рыбы в прудовых хозяйствах СССР/ Ред Федорченко В.И., Михеева В.П. - М. ВНИИПРХ - 1986 - 186 с
46. Филзенко О.Ф. Некоторые универсальные закономерности действия химических агентов на водные организмы // Автореф дисс докт биол наук 03-00-18 МГУ - М 1990 - 36 с
47. Хлебонич В.В. Акклимация животных организмов Л. Наука, 1981. - 135 с.
48. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. - М. Мир, 1988. - 568 с.
49. Шульман Г.Е., Абдумасова Г.И., Столбов А. Я. Использование белка в энергетическом обмене гидробионтов // Успехи совр. биол - 1993 - Т 113, № 5 - С 576-586.
50. Atkynson D.E. The energy change of adenylate pool as a regulatory parameter // Biochemistry - 1968 - Vol 2, N 11 - P 4030 - 4034.
51. Begun S.J. Biochemical adaptive responses in glucose metabolism of fish (*Tilapia mossambica*) during ammonia toxicity // Curr Sci (India) - 1987 - Vol 56, N 14 - P 705-708
52. Bergmeyer H.U. Principles of enzymatic analysis / Methods of enzymatic analysis. - Weinheim Verlag Chemie, 1963 - P 3-13
53. Bergmeyer H.U., Bernl E. L-lactate, 2 - Oxoglutarate, L-glutamate / Methods of enzymatic analysis - Weinheim Verlag Chemie, 1963 - P 266; 324-339; 384-388
54. Brady L.J., Hoppel, Brady P.S. Hepatic mitochondria innermembrane properties, b-oxydation and carnitine palmitoyltransferases A and B // Biochem J. - 1986. - Vol. 233, N 2 - P.427-433
55. Caamano G.J., Iglesias J., Marco C., Linares A. In vivo utilization of (3-4 °C) acetoacetate for lipid and ammo acid synthesis in the 15 day-old chick // Comp Biochem. and Physiol. 1988 Vol 91, N 1 - P 1-15
56. Chang Vol.M, Idler D.R. Biochemical studies on sockeye salmon during spawning migration - Liver glycogen // Can. J Biochem. Physiol.- 1960. - Vol 38, N 4 - P 553-558
57. Creach Y., Serfaty A. Physiol J, Paris. - 1974. - Vol 68 - P 245-260.
58. Cyore K., Janurik E., Olah J., Szabo P. A ponty (*Cyprinus carpio* L.) ammóniafüggő legzése es ammóniaaurtete // Halaszat - 1984 Vol. 30, N 3. - P. 81-83.

- 59 Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G H A simple method for the isolation and purification from animal tissues total lipides (for brain, liver and muscle) // *J Biol Chem* — 1957 — Vol 226, N 1 - P 497-509
- 60 Glutamate dehydrogenase Lactate dehydrogenase Malate dehydrogenase / *Biochemica Information* — Vol 1, 2 — W Germany Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, 1975 — P 211-228
- 61 Hyghes G M General anatomy of the gills // *Fish Physiol* — 1984 — Vol 40, N 2 — P 123-138
- 62 Iwata Katsuya Nitrogen metabolism in the mudkipper *Periophthalmus cantonensis* changes in free amino acids and related compounds in various tissues under conditions of ammonia loading, with special reference to its high ammonia tolerance // *Comp Biochem and Physiol* — 1988 — Vol 91, N 3 — P 499-508
- 63 Jeney G, Nemescok J, Jeney Zs, Olah J Acute effect of sublethal ammonia concentrations on common carp (*Cyprinus carpio* L.) II Effect of ammonia on blood plasma transaminases (GOT, GPT), GDH enzyme activity and ATP value // *Aquaculture* 1992 - Vol 104, N 1-2 - P 149-156
- 64 Katz A, Messineo F C Lipid-membrane interactions and the pathogenesis of ischemic damage in the myocardium // *Circ Res* — 1981 — Vol 48, N 1 -- P 1-16
- 65 Kinsella J F General metabolism of the hexapod embryo with particular reference to lipids // *Comp Biochem Physiol* - 1966 Vol 19, N 1 — P 291-304
- 66 Knights B Effect of ammonia accumulation on metabolic rates and growth of European eel *Anquilla anquilla* L in relation to warmwater aquaculture // *Aquacult and Fish Manag* -- 1989 — Vol 20, N 1 -- P 111-117
- 67 Linko R The lipid composition of Baltic herring // *Suomen Kem* — 1964 — Vol 37, N 5-6 — P 90-92
- 68 Lowenstein I M Ammonia production in muscle and other tissues. The purine nucleotide cycle // *Physiol Rev* — 1972 — Vol 52, N 2 — P 384-414
- 69 Lowery J A The lipids of marine organisms // *Oceanogr and Marine Biol Annual Rev* — 1964 — N 2 — P 169-191
- 70 Lowry O H, Rosenbroug N I, Farr A L, Randall R I Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J Biol Chem* — 1951 - Vol 193, N 1 -- P 265-275
- 71 Mehrle P M, Bloomfield R A Ammonia detoxifying mechanisms on rainbow trout altered by dietary dieldrin // *Toxicol Appl Pharmacol* — 1974 — Vol 27, N 3 — P 609-613
- 72 Mehrle P M, Stalling O L, Bloomfield R A Serum amino acids in rainbow trout as effected by DDT and dieldrin // *Comp Biochem Physiol* — 1971 -- Vol 38, N 3 -- P 373-377
- 73 Metabolic compartmentation / Ed H Sies -- New-York Academic Press, 1982 — P 205-226
- 74 Nemescok J, Gyore K, Olah J, Boross I. Effect of NH₃ on blood glucose and catecholamine level GOT, GPT, GDH enzyme activity and respiration of fishes // *Fish, Pathog and Environ Tur Polycult* — Budapest, 1984 — P 209-217
- 75 Ogata F, Kondo K, Kimura S, Yoshitoshi Y Obediency on Ca²⁺ of ATP-stimulated uncoupled oxidation of succinate in rat liver mitochondria // *Biochem Biophys Res Commun* — 1972 — Vol 46, N 2 — P 640-645
- 76 Ogata H, Murai T Effects of ammonium chloride administration on ammonia and free amino acid levels in erythrocytes and plasma of carp // *Bull Jap Soc Sci Fish* — 1987 — Vol 53, N 7 — P 1257-1260
- 77 Orban L, Tatrai I A különbozo kornyezeteli ammonia koncentraciók hatására a pontyivadéknak (*Cyprinus carpio* L.) nitrogén-anyaqcseréjére // *Halaszat* 1987 — Vol 33, N 5 — P 156-158
- 78 Palackova I, Hrasek I, Paul A Úcinek sublethalni koncentrace amoniaku na vubrane fyziologicke ukasatele u karpjho pludku (*Cyprinus carpio* L.) // *Zivoc vyroba* — 1986 — Vol 31, N 10 — P 893-900
- 79 Prasad T A Vol, Srinivas T, Reddy D C Modulation in nitrogen metabolism in the hepatic and neuronal tissues of fish, *Tilapia mossambica*, exposed to atrazine // *Biochem Int* — 1991 — Vol 23 N 2 — P 271-279
- 80 Radhaiah Vol, Gryya M, Jayantha Rao K Changes in selected biochemical parameters in the kidney and blood of the fish, *Tilapia mossambica* (Peters), exposed to heptachlor // *Bull Environ Contam and Toxicol* 1987 — Vol 39 N 6 — P 1006-1011
- 81 Rajyasree M Alteration in protein metabolism of fish *Cyprinus carpio* L on exposure to ambient urea // *J Curr Bioc* — 1993 — Vol 8, N 2 — P 49-52
- 82 Ramu Vol J, Janajah C Ammonia metabolism in freshwater teleost, *Clarias batrachus* (Linn) on exposure to trichlorfon // *Bull Environ Contam and Toxicol* — 1991 — Vol 46, N 5 — P 731-737
- 83 Rao K S P, Ahmad I K, Rao K Vol R Impact of methyl parathion on the tissue NH₄⁺-changes in the fish *Tilapia mossambica* (Peters) // *Proc Indian Nat Sci Acad* — 1981 — Vol B 47, N 3 — P 394-397
- 84 Reddy P M Bashamohideen Md Toxic impact of fenvalerate on the protein metabolism in the branchial tissue of a fish, *Cyprinus carpio* // *Curr Sci (India)* — 1988 — Vol 57, N 4 — P 211-212
- 85 Seligson D, Seligson H A Microdiffusion method of the determination of nitrogen liberated as ammonia // *Z chim nud* — 1951 — Vol 32, N 3 — P 324-327

86. Sreedevi P, Sivaramakrishna B, Suresh A., Radhakrishnaiah K. Effect of nickel on some aspects of protein metabolism in the gill and kidney of the freshwater fish, *Ciprinus carpio* L // *Environ Pollut* — 1992. — Vol 77, N 1 — P 59-63
87. Teylor I. A modified procedure for the microdetermination of citric acid // *Biochem J* — 1953 — Vol. 54, N 1 — P. 62-65
88. Walton M J, Cowey C B. Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish // *Comp Biochem Physiol* — 1982 — Vol 73B, N 1 — P. 59-79.
89. Wu G., Thompson J R. Ketone bodies inhibit leucine degradation in chick skeletal muscle // *Int. J Biochem* — 1987 — Vol 19, N 10 — P 937-942

V.V. Grubinko, V.O. Arsan, I.M. Konovets'

THE ENERGY STATUS OF FISHES' ORGANISMS AT INTOXICATION BY AMMONIA

The pollution of intrinsic reservoirs, including fish-farming, is one of the limiting factors of functioning of aqueous ecosystems and their bioeffecting. In this connection the study of physiologically-biochemical mechanisms of acclimatization and fishes' metabolic processes in polluted aqueous ecosystems is one of the main conditions for development of effective methods of increasing stability of water organisms to new conditions of existence

Надійшла 23.02.2001

УДК 636.2:599.323.41:576.344

В.З. Курані, С.В. Бродін, Ю.В. Синюк

Тернопільський державний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка
46027 Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2

ВПЛИВ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА МЕТАБОЛІЗМ ГЛІЦИНУ В ОРГАНІЗМІ КОРОПА В УМОВАХ IN VIVO

прісноводні риби, важкі метали, метаболізм, гліцин

Серед вільних амінокислот гліцину належить особлива функціональна роль. Це пояснюється його надзвичайною метаболічною лабільністю та швидкістю перетворення. Відома активна участь гліцину у синтезі білків та нуклеїнових кислот, в субстратному забезпеченні ліпогенезу та глюконеогенезу, а також використання як енергетичного субстрату [2]. Різноманітну функціональну роль гліцину в організмі риб. Він регулює осмотичний тиск в м'язових клітинах риб, накопичуючись в цій тканині в значних кількостях. Зокрема, у коропа гліцин є домінуючою амінокислотою м'язів [9]. Ця амінокислота виконує у риб роль харчового стимулятора, а також підвищує їх стійкість до низьких температур. Разом з глюкозою гліцин зв'язує вільну воду в м'язах та інших тканинах риб і тим самим знижує температуру її замерзання на десяті частки градуса [7].

Численними дослідженнями, проведеними на різних видах риб, було показано, що вільні амінокислоти в організмі цих пойкилотермних тварин є добрим і доступним джерелом енергії [8,11]. Особливо важливого значення вільні амінокислоти, особливо гліцин, набувають в період зимового голодування [10]. Показано також участь гліцину в адаптації гідробіонтів до дії іонів важких металів [5]. Саме тому метою нашої роботи стало вивчення ролі гліцину та продуктів його метаболізму у забезпеченні опірності та адаптації організму коропа до дії підвищених концентрацій у водному середовищі іонів марганцю, цинку, міді та свинцю.

Матеріали і методи досліджень

Досліди проводили на дворічках коропа (*Cyprinus carpio* L.) масою 250-300г. Вивчали вплив на риб іонів Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} та Pb^{2+} в концентраціях 2, 4 та 6 мг/л, 2 і 5 мг/л, 0,1 і 0,5