

ГІДРОБІОЛОГІЯ

УДК 551.331.1:574.2:591.525(639.3.036591.133.1)

В. М. МАРЦЕНІЮК, О. С. ПОТРОХОВ, О. Г. ЗІНЬКОВСЬКИЙ

Інститут гідробіології НАН України
пр-т Героїв Сталінграду, 12, Київ, 04210

АДАПТИВНА БІОХІМІЧНА ВІДПОВІДЬ КОРОПА ТА ОКУНЯ НА ДІЮ ПІДВИЩЕНОГО ТЕМПЕРАТУРНОГО РЕЖИМУ ВОДИ

Досліджено фізіолого-біохімічний стан та особливості енергетичного обміну риб різних таксономічних статусів за дії підвищеної температури води. Встановлено, що ізоляція від несприятливого температурного чинника у окуня та коропа на біохімічному рівні відбувається по-різному. Активність АТФ-ази у м'язах коропа та зябрах окуня зростає. Активність ензимів енергетичного обміну свідчить про формування гіпоксичного стану у тканинах як у коропа, так і в окуня. В обох видів риб вміст глікогену в печінці із зміною температурного режиму зростає, що може свідчити про порушення його окиснення. Виявлені зміни біохімічних показників у коропа і окуня відмінні і свідчать про специфічну видову реакцію риб на нетипові зміни температурних умов.

Ключові слова: окунь, короп, температура, енергетичний обмін, ензими, глікоген

Температура води – один із найдієвіших екологічних чинників як наземного, так і водного середовища [7]. Її зміна впливає не лише на швидкість протікання хімічних реакцій, але й визначає загальний фізіологічний стан організму. Діапазон температур для різних живих істот порівняно широкий, але для екзотермних гідробіонтів навіть незначні коливання цього показника можуть викликати значні зміни в метаболізмі [7, 14].

Кліматичні зміни, що спостерігаються впродовж останнього часу, змушують організми формувати компенсаторні механізми до дії несприятливого чинника. У першу чергу це проявляється у зміні ензимної активності. Кореляція між температурою середовища і ензимною активністю в різних тканинах організму регулюється в деяких випадках згідно з законом Вант-Гоффа і Арреніуса, тобто із збільшенням активності вдвічі при підвищенні температури на 10°C [8, 9, 14]. Проте, в більшості випадків ці умови не витримуються, особливо у екзотермних тварин. Активність ензимів енергетичного обміну (лактатдегідрогенази та сукцинатдегідрогенази) великою мірою залежить від змін температури і є важливим показником термоадаптації риб [2, 5, 7, 9]. K^+ , Na^+ -залежна АТФ-аза, ензим із групи транспортних аденозинтрифосфатаз, також відіграє важливу роль у процесах адаптації до підвищеного температурного режиму водойми [10, 11, 17].

Той факт, що багато ензимів має множинні молекулярні форми, показує характер протікання реакцій в певному конкретному органі, і може бути одним із механізмів, який екторермні тварини використовують для компенсації зміни температури [5, 14]. Тому важливим є вивчення і порівняння активності ензимів, які каталізують реакції у різних органах, зокрема у м'язах та зябрах.

Визначальною при подібній адаптації є також кількість енергії, що утворюється в процесі енергетичного обміну. При цьому частина енергії використовується рибами відразу, а частина зберігається, зокрема у формі глікогену, який накопичується у печінці та м'язах [13, 15].

Виходячи із зазначеного, метою роботи було вивчення впливу підвищеного температурного режиму води на активність окремих ензимів енергетичного та іонного обміну у різних тканинах риб, а також визначення вмісту глікогену у їх печінці за згаданих умов.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведено у червні місяці на дворічках окуня річкового *Perca fluviatilis* L. та коропа звичайного *Cyprinus carpio* L. на Білоцерківській експериментальній гідробіологічній станції Інституту гідробіології НАН України. Риби були поміщені в експериментальні акваріуми об'ємом 75 дм³, наповнені водою із р. Рось, яка змінювалась 1 раз на 3 доби, та облаштовані системою нагрівання та аерації. У 5-тьох експериментальних акваріумах вода впродовж дня поступово нагрівалася до 24°C (контроль), 26°C, 28°C, 30°C та максимальної температури 34°C, а на ніч нагрівачі вимикали, що створювало середнє коливання температури у кожному акваріумі впродовж природного фотоперіоду на 1°C, 2°C, 4°C, 6°C та 7–8°C відповідно.

Вміст розчиненого кисню підтримувався в межах 5,5±0,9 мг/дм³ (з підвищенням температури вміст кисню у воді дещо знижувався), рН – 7,0±0,2. Період аклімації риб становив 14 діб, що є достатнім для формування адаптивної відповіді на дію стрес-чинника. Окуня під час експерименту годували молоддю чебачка амурського та хірономідами, а коропа комбікормом для коропових риб.

Після 14-добової аклімації риб відбирали тканини печінки, зябер та м'язів, та гомогенізували. У лабораторних умовах спектрофотометрично визначали активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) з використанням стандартного комерційного набору «ЛДГ» (Філісіт-Діагностика, Україна). Активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) встановлювали стандартним методом за кількістю відновленого гексаціаноферату (III) калію [3]. Активність Na⁺, K⁺-АТФ-ази оцінювали за наростанням у реакційній суміші вмісту неорганічного фосфору, який виявляли за методом Фіске та Суббароу і перераховували на 1 мг білка [1, 3]. Вміст білків у м'язах та зябрах визначали за Лоурі, вміст глікогену у печінці – за допомогою антронового реактиву згідно з методом [6], вимірюючи інтенсивність зелено-синього забарвлення, отриманого в результаті реакції, на спектрофотометрі при довжині хвилі 620 нм.

Статистичну обробку даних проводили з використанням програм Statistica 10.0 та програми Excel із пакету Microsoft Office.

Результати досліджень та їх обговорення

В результаті дослідження встановлено, що у коропа із підвищенням температури (від 24°C до 34°C) відбувається поступове незначне збільшення АТФ-азної активності у м'язах, що за максимальної температури сягнуло показника, який на 26% вищий від контрольного значення (рис. 1).

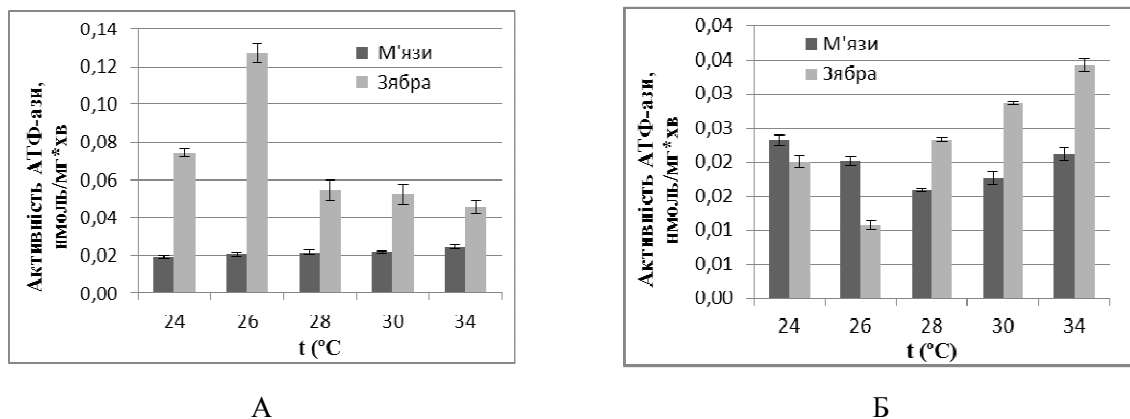


Рис 1. АТФ-азна активність у м'язах і зябрах коропа (А) та окуня (Б) за дії підвищеної температури води, (M±m, n=5)

У зябрах можна зауважити практично обернену закономірність: за температури 26 °С активність ензиму спочатку стрімко зросла у 1,71 рази щодо контролю, а потім поступово знижувалася та за температури 34 °С зменшилася порівняно з контрольним значенням у 1,64 рази. Виявлена закономірність у м'язах коропа може свідчити про те, що із підвищенням температури для забезпечення енантіостазу організму риб витрачається більша кількість енергії, що вивільняється в процесі гідролізу АТФ. Тут безпосередню участь відіграє саме гідролазна АТФ-аза, тому із зміною температурного режиму відбуваються і відповідні зміни як і в активності даного ензиму, так і в біоенергетиці організму в цілому [8, 10, 17]. У зябрах, вочевидь, температурний чинник стимулював активацію анаболічної гілки метаболізму, що і могло відобразитись на зниженні активності ензиму.

У окуня зміна АТФ-азної активності за згаданих умов має коливальний характер. Спочатку, при підвищенні температури на 2 °С та 4 °С активність ензиму у м'язах поступово знижувалася і набула мінімального значення за температури 28 °С (у 1,53 рази менша щодо контролю) (див. рис. 1). У подальшому спостерігалось зростання АТФ-азної активності, а за максимальної температури становила 0,021 нмоль/мг білка×хв., що у 1,09 рази менше від контролю.

У зябрах окуня активність ензиму за температури 26°С спочатку зменшилася на 50%, а при подальшому підвищенні температури стрімко зростала. За температури 34°С вона набула значення, вищого від контроль у 1,70 рази.

Виявлені зміни АТФ-азної активності у м'язах окуня можуть свідчити про активацію анаболічних реакцій, спрямованих на протидію стрес-чиннику, а також про сповільнення гідролізу АТФ [5, 17]. Підвищення активності АТФ-ази у зябрах може бути результатом активації компенсаторного механізму, спрямованого на використання більшої кількості енергії для забезпечення життєдіяльності [8].

Досліджено також активність сукцинатдегідрогенази. Встановлено, що у м'язах коропа активність цього ензиму із підвищенням температурного режиму спочатку стрімко знизилася, а при 26°С набула значення у 2,05 рази меншого щодо контролю (рис. 2).

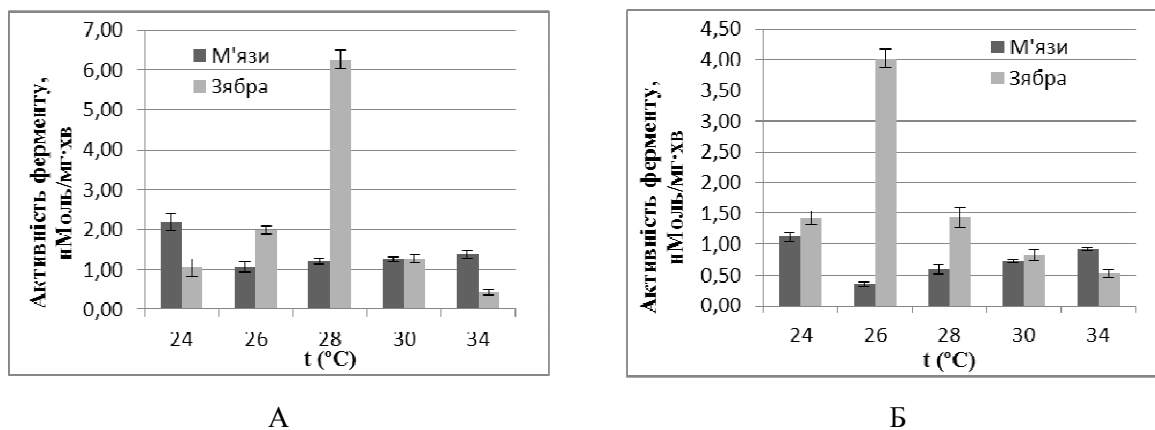


Рис 2. Активність сукцинатдегідрогенази у м'язах та зябрах коропа (А) та окуня (Б) за дії підвищеної температури води, ($M \pm m$, $n=5$)

В подальшому спостерігалось незначне зростання активності СДГ, нижче рівня контролю. За максимальної температури активність ензиму становила 1,39 нмоль/мг білка×хв, що є меншим від контролю у 1,51 рази.

У зябрах коропа активність СДГ із підвищенням температурного режиму характеризується параболічною залежністю. Варто відмітити, що максимальн активність ензиму була за температури 28°С – 6,26 нмоль/мг·білка×хв, тобто в 6,01 рази вищою від контролю. В подальшому активність СДГ знизилася та при 34°С і стала меншою від контролю у 2,36 рази.

Оскільки функціонування СДГ залежить від постачання у клітини кисню, то зниження його активності може свідчити про настання гіпоксії у тканинах риб [7, 9]. У зябрах початкові коливання температури, вочевидь, зумовлюють позитивну кореляцію між активністю ензиму та підвищенням температурного режиму. Проте, в подальшому висока температура все ж інгібує аеробні процеси в організмі риб, про що свідчить активність СДГ [8].

В окуня активність цього ензиму у м'язах має таку ж закономірність, як і в коропа. Проте, у зябрах початкове зростання активності СДГ спостерігається вже при 26°C та становить 4,01 нМоль/мг білка×хв, що є у 2,86 рази вище від контролю.

Активність ЛДГ у досліджуваних видів риб суттєво відрізняється. Щодо коропа, то за температури 26°C у його м'язах спостерігається вірогідне зниження активності ензиму у 2,47 рази порівняно із контролем (рис. 3).

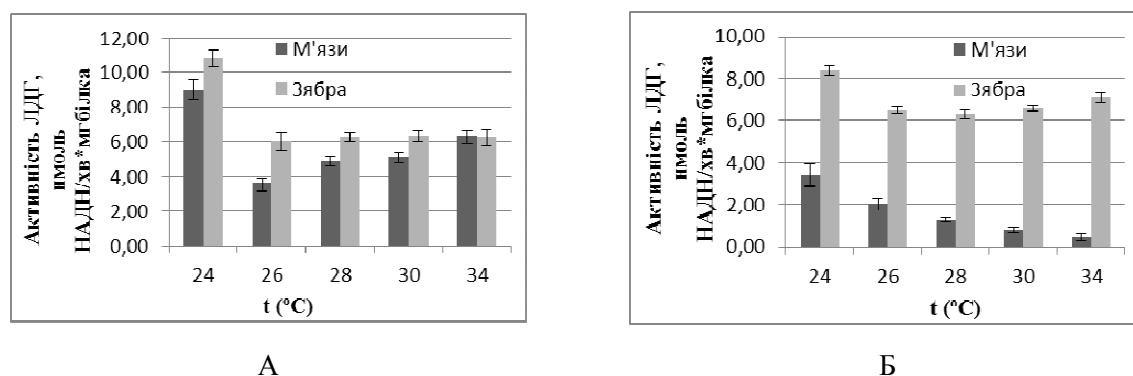


Рис 3. Активність лактатдегідрогенази у м'язах та зябрах коропа (А) та окуня (Б) за дії підвищеної температури води, ($M \pm m$, $n=5$)

Починаючи від 28°C активність ЛДГ поступово зростає, але все ж залишається нижчою від контролю, а за температури 34°C є меншою від контрольного значення у 1,39 рази.

У зябрах коропа за температурного режиму 26°C активність ензиму у 1,78 рази щодо контролю знижується, а при подальшому підвищенні температури залишається майже на одному рівні.

Виявлений показник активності одного із основних гліколітичних ензимів може свідчити про стабільно сповільнене протікання анаеробних процесів у тканинах коропа [11, 12, 16].

Щодо окуня, то у його м'язах відмічено поступове значне зниження активності ЛДГ, що за температури 34°C у 7,23 рази меншого від контролю (див. рис. 3). У зябрах активність ензиму подібна до показників у коропа, проте від початкового зниження активності при 26°C у 1,28 рази щодо контролю, в подальшому спостерігається поступове незначне підвищення активності ЛДГ, що за максимальної температури менше від контролю у 1,16 рази.

Згідно з отриманими даними можна стверджувати, що гліколітичні процеси у м'язах окуня із підвищенням температури сповільнюються, що може бути зумовлено низькою стійкістю цього виду до підвищеної температури [2, 16].

Щодо вмісту глікогену, то його показники в обох видів риб відрізняються. За температури 28°C у коропа спостерігається вірогідне збільшення кількості глікогену у печінці у 4,2 рази вище контролю (рис. 4).

В подальшому, при наступному зростанні температури на 2 та 4°C відмічена незначна його розщеплення. За температури 34°C вміст глікогену був вищим щодо контрольного значення у 2,81 рази. Ці зміни можуть бути спричинені підсиленням глікогенезу у печінці коропа внаслідок підвищення температури [13]. Проте, за ще більш високих температур для забезпечення енергетичного балансу в організмі риб виникає потреба у більшій кількості глюкози. Одним із шляхів її утворення є глікогеноліз, який, вірогідно, має місце, починаючи з 30°C. У подальшому за цих умов рівновага між утворенням глікогену і його утилізацією може порушитися, що призведе до негативних для організму риб наслідків [13, 15].

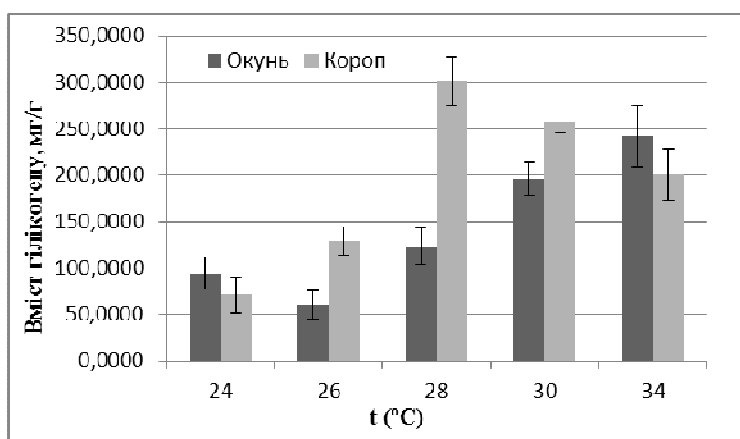


Рис 4. Вміст глікогену у печінці коропа та окуня за дії підвищеної температури води, ($M \pm m$, $n=5$).

В печінці окуня відмічено початкове зниження кількості глікогену за температури 26°C у 1,54 рази менше контролю, та наступне підвищення його вмісту до 241 мг/г при 34°C, що є у 3,39 рази вище від контрольного значення. Очевидно, за настання стресових умов у печінці окуня відбувається накопичення глікогену, що може бути результатом активації глікогенезу. Не виключено також, що підвищена температура може інгібувати ензимну систему глікогенолізу у печінці окуня, що і відображається у неспроможності ним здійснювати утилізацію цього енергетичного субстрату [8, 13, 15].

Висновки

Отже, отримані в результаті дослідження дані дають змогу стверджувати, що обидва види риб, які відносяться до різних таксономічних статусів, на зміну температурного режиму реагують по-різному:

1. АТФ-азна активність у м'язах коропа та зябрах окуня свідчить про посилення гідролітичної функції ензиму.
2. Показники активності СДГ у тканинах досліджуваних видів риб свідчать про розвиток гіпоксії у м'язах риб із підвищенням температури води.
3. Активність ЛДГ у м'язах коропа та окуня має обернений характер, а в окуня свідчить про суттєве пригнічення гліколітичного шляху окислення.
4. Як в коропа так і в окуня вміст глікогену в печінці із зміною температурного режиму зростає, що може бути викликано порушенням його утилізації.

1. *Асатиани В. С.* Ферментные методы анализа / В.С. Асатиани. — М.: Наука, 1969. — 740 с.
2. *Гулевский А. К.* Роль гликолиза при холодовой адаптации карася серебряного *Carassius auratus gibelio* / [А.К. Гулевский, Л.И. Релина, Е.Г. Жегунова и др.] // Пробл. криобиологии. — 2007. — 17, № 1. — С. 64—70.
3. *Кондрашова М. Н.* Метод определения неорганического фосфора по спектрам поглощения в ультрафиолете / М.Н. Кондрашова, М.Н. Лесогорова, С.Э. Шноль // Биохимия. — 1965. — Т. 30, Вып. 3. — С. 567—572.
4. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен).* — Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. — 272 с.
5. *Мехед О. Б.* Активность некоторых ферментов углеводного обмена в тканях сеголеток и двухлеток карпа в осенний период / О.Б. Мехед, Б.В. Яковенко, А.А. Жиденко // Гидробиол. журн. — 2004 — Т. 40, № 3. — С. 83—89.
6. *Практикум по биохимии* / ред. Северин С.Е., Соловьева Г.А. — М.: Изд-во МГУ, 1989. — 510 с.
7. *Романенко В. Д.* Механизмы температурной акклимации рыб / В.Д Романенко, О.М Арсан, В.Д Соломатина. — Киев: Наукова думка, 1991. — 192 с.

8. Шульман Г. И. Физиолого-биохимические аспекты энергетического обмена у рыб / Г.И. Шульман, Г.А. Финенко // Биоэнергетика гидробионтов. — К.: Наук. думка, 2001. — С. 17—20.
9. Alesander A. Evaluation of changes in metabolic parameters and enzymes involved in metabolic pathways in *Clarias botrachus* after exposed to phenolic compounds / A Alesander., O.P Verna., A Mathur // Asian journal of biomedical and pharmaceutical sciences. — 2013. — Vol. 3, № 21. — P. 60—67.
10. Bogdanova A. B. Hypoxic responses of Na⁺/K⁺ ATPase in trout hepatocytes / A.B. Bogdanova, B. Grenacher, M. Nikinma, M. Gassmann // J. Exp. Biol. — 2005. — Vol. 208. — P. 1793—1801.
11. Brinson B. E. Lactate Dehydrogenase and Na⁺/K⁺ ATPase Activity in *Leiostomus xanthurus* (Spot) in Response to Hypoxia. Explorations / B.E. Brinson, D. Huffman, M.M. Shaver [et al.] // Biological, Earth, and Physical Sciences. — 2007. — P. 22—29.
12. Chan F. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase Activity / F Chan [et al.] // Methods in molecular biology. — 2013. — Vol. 979. — P. 65—70.
13. Hems D. A. Control of hepatic glycogenolysis / D.A. Hems, P.D. Whitton // Physiol. Rev. — 1980. — № 60. — P. 1—50.
14. Jobling M. Temperature tolerance and the final preferendum—rapid methods for the assessment of optimum growth temperature / M Jobling // J. Fish. Biol. — 1981. — Vol. 19, № 4. — P. 439—455.
15. Roach P. J. Glycogen synthase and glycogen synthase kinases / P.J. Roach // Curr. Top. Cell. Regul. — 1981. — № 20. — P. 45—105.
16. Tseng Y. C. Regulation of Lactate Dehydrogenase in *Tilapia* (*Oreochromis mossambicus*) Gills during Acclimation to alinity / [Y.C. Tseng, J.R. Lee, J.C.H. Chang et al.] // Challenge Zoological Studies. — 2008. — Vol. 47, № 4. — P. 473—480.
17. Watson C. F. Comparative activity of gill ATPase in three freshwater teleosts exposed to cadmium / C.Watson, W. Benson // Ecotoxicology and Environmental Safety. — 1987. — Vol. 14. — P. 252—259.

В. Н. Марценюк, А. С. Потрохов, О. Г. Зиньковський

Институт гидробиологии НАН Украины, Киев

АДАПТИВНЫЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ОТВЕТ КАРПА И ОКУНЯ НА ДЕЙСТВИЕ ПОВЫШЕННОГО ТЕМПЕРАТУРНОГО РЕЖИМА ВОДЫ

Исследованы физиолого-биохимическое состояние и особенности энергетического обмена рыб различных таксономических статусов за действия повышенной температуры воды. Установлено, что изоляция от неблагоприятного температурного фактора в окуня и карпа на биохимическом уровне происходит различным образом. Активность АТФ-азы в мышцах карпа и жабрах окуня свидетельствует об усилении гидролизной функции фермента. Активность ферментов энергетического обмена свидетельствует о наступлении гипоксии в тканях как у карпа так и в окуня. В обоих видов рыб содержание гликогена в печени с изменением температурного режима растет, что может свидетельствовать о нарушении его утилизации. Полученные изменения биохимических показателей у карпа и окуня указывают на межвидовой разницу в реакции этих видов на нетипичные изменения температурных условий

Ключевые слова: окунь, карп, температура, энергетический обмен, ферменты, гликоген

V. M. Martseniuk, A. S. Potrokhov, O. G. Zinkovskyi

Institute of Hydrobiology of NAS of Ukraine, Kyiv

ADAPTIVE BIOCHEMICAL RESPONSE CARP AND PERCH ACTION ON INCREASED WATER TEMPERATURE REGIME

Investigated physiological and biochemical status and characteristics of energy metabolism of fish of different taxonomic status of the elevated water temperatures. We know that climate change observed over the past century, forcing living organisms to generate compensatory mechanisms of adverse factors. This is primarily manifested in the change of enzymatic activity of many biochemical reactions in the body of the fish. The fact that enzymes are heterogeneous and each isoenzyme shows the character of the reactions in a particular organ, can be one of the mechanisms that poikilothermic animals use to compensate for changes in temperature.

Established that isolation from adverse temperature factor in perch and carp at the biochemical level occurs in different ways. ATPase activity in muscles gills of carp and perch indicates the gain function of the enzyme hydrolysis in turn muscle perch it can cause activation of anabolic reactions to

counteract the stress factor. Also, the increased activity of the enzyme in the gills may result from activation of compensatory mechanisms aimed at using more energy for normal life. SDG indicators of activity in the tissues studied species mostly correlated and indicate the onset of hypoxia in the muscles of fish from increasing water temperatures. The only difference can be noted in the gills perch, namely the initial increase in activity SDG already at 26 ° C. LDH activity in the muscles of perch and carp has turned nature and perch indicates significant inhibition of glycolytic pathways. This activity is one of the key glycolytic enzymes in carp tissues may indicate a bit slow, but more or less stable passage anaerobic processes. In both species glycogen content in the liver with changing temperature conditions increases, which may indicate a breach of its utilization. These changes can be caused by amplification glikogeneza carp in the liver due to an increase in temperature. It is also possible that high temperatures can inhibit the enzyme system in the liver glycogenolysis perch, which is reflected in his inability to carry out the disposal of the aforementioned energy substrate.

The resulting changes in biochemical parameters of carp and perch indicate interspecific differences in these types of reactions to unusual changes in temperature conditions. Later in natural waters may determine the whereabouts of these fish, and artificial - they fish productivity.

Keywords: perch, carp, temperature, energy metabolism, enzymes, glycogen

Рекомендує до друку

В. В. Грубінко

Надійшла 08.02.2017

УДК 612: [597. 551.2: 591.044]:577.17

О. С. ПОТРОХОВ, О. Г. ЗІНЬКОВСЬКИЙ, Ю. М. ХУДІЯШ, М. В. ПРИЧЕПА

Інститут гідробіології НАН України
пр-т Героїв Сталінграду, 12, Київ, 04210

ОСОБЛИВОСТІ ПРИСТОСУВАННЯ РИБ ДО ЗМІНИ ТЕМПЕРАТУРИ І МІНЕРАЛІЗАЦІЇ ВОДИ ЗА ПОКАЗНИКАМИ ВМІСТУ ТРИЙОДТИРОНІНУ, КОРТИЗОЛУ І ГЛЮКОЗИ У ПЛАЗМІ КРОВІ

Розглянуто вплив температури та мінералізації води на вміст трийодтироніну, кортизолу та глюкози у плазмі крові плітки та коропа. Встановлено, що після 14-ти добової аклімації до підвищення температури води до 32°C не спостерігається істотних змін вмісту кортизолу у плазмі крові риб, але вміст трийодтироніну суттєво знижується. Показано, що ці зміни у плітки проходили інтенсивніше, ніж у коропа. Відмічено, що у плітки зростання вмісту глюкози спостерігається за нижчої температури (25–30°C), ніж у коропа. Зміна мінералізації води корегує відповідь риб на дію температури води. Плітка є більш чутливою до нетипово високої температури води при більшій її мінералізації, ніж коропа.

Ключові слова: короп, плітка, трийодтиронін, кортизол, глюкоза, мінералізація, температура, метаболізм

Останнім часом у наукових дослідженнях приділяється значна увага змінам клімату. Зацікавленість цією проблемою пояснюється появою фактів порушення стану довкілля, викликаного підвищенням середньостатистичної температури повітря і води [2, 3, 14]. Одним із пріоритетних напрямків цих досліджень є визначення наслідків потепління на водні екосистеми.

У більшості випадків порушення нормальної життєдіяльності гідробіонтів пов'язане зі зміною температурного балансу водойм [10]. Відомо, що значна частина водних організмів, у