

УДК 577.1:574.64

В. О. КОВАЛЬ

Чернігівський національний педагогічний університет імені Т. Г. Шевченка
вул. Полуботка 53, Чернігів, 14000

СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗНА АКТИВНІСТЬ В ТКАНИНАХ КОРОПА В УМОВАХ ЗИМОВОГО ГОЛОДУВАННЯ ЗА ДІЇ ТОКСИКАНТІВ РІЗНОЇ ХІМІЧНОЇ ПРИРОДИ

Досліджено активність сукцинатдегідрогенази у печінці та білих м'язах коропа при підвищеній концентрації фенолу, йонів важких металів (Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), амоніаку, що відповідає 2 рибогосподарським ГДК. Встановлено, що зміни досліджуваного показника залежать не тільки від природи токсиканту, а і від сезону зимового голодування.

Ключові слова: сукцинатдегідрогеназа, короп, фенол, важки метали, амоніак, зимове голодування

Відходи промисловості та сільського господарства, потрапляючи у водойми у вигляді хімічних сполук, діють на всі системи організму гідробіонтів, призводять до порушення в організмі риб окремих ланок метаболізму, послаблюючи життєздатність та викликаючи різноманітні хвороби. Хімічні методи дослідження токсикантів у водному середовищі дозволяють встановити тільки відповідність існуючим норма, а реальний біологічний ефект не враховується. Тому останнім часом впроваджуються екотоксикологічна оцінка водних об'єктів, яка заснована на методах біоіндикації та біотестування [5]. Згубний ефект токсичних речовин засновано на відхиленні окремих показників метаболізму риб або на появі в їх клітинах неспецифічних молекул (білків, ферментів, ліпідів) [2]. Дослідження активності одного з ферментів циклу трикарбонових кислот – сукцинатдегідрогенази (СДГ) в тканинах коропа в різні періоди зимового голодування за дії токсикантів різної хімічної природи стало метою нашої роботи.

Матеріал і методи досліджень

Досліди проведено на коропах (*Cyprinus carpio* L.) дворічного віку масою 180 - 250г. Риб утримували в лабораторних акваріумах об'ємом 200 л з відстояною водопровідною водою зі стандартними гідрохімічними показниками: вміст кисню становив $(7,5 \pm 0,5)$ мг/дм³; вуглекислого газу – $(2,5 \pm 0,3)$ мг/дм³; рН (7,6-7,8). Необхідні концентрації токсикантів у воді, що відповідали 2,0 рибогосподарським ГДК [1], створювали при внесенні фенолу; відповідних солей $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $Pb(NO_3)_2$ та буферної суміші $NH_4OH + NH_4Cl$. Під час експерименту риб не годували. Період аклімації їх в токсичних умовах становив 14 діб, що є достатнім для формування адаптивної відповіді на дію стрес-фактора [7].

Досліджували активність сукцинатдегідрогенази у мітохондріальній фракції тканин печінки та білих м'язів. Виділення мітохондрій здійснювали за загальноприйнятою методикою [11], додатково очищували центрифугуванням у градієнті густини сахарози 0,32-1,2М [3]. Інкубаційна суміш для визначення СДГ-азної активності містила в об'ємі 3 см³: 100мМ K^+ -фосфатного буферу, рН 7,8; бурштинову кислота (0,1 М, нейтралізовану до рН =7,8; розчин червоної кров'яної солі (0,03 М) [11]. Ферментну активність виражали в мкмоль окисленого субстрату із розрахунку на 1 мг білка за 1 хвилину.

Результати досліджень та їх обговорення

Експериментальні результати виявили (рис.1.), що залежно від періоду зимового голодування активність досліджуваного ферменту циклу Кребса в печінці і м'язах коропа суттєво змінюється. Так, на початку зимівлі (жовтень – листопад) СДГ-азна активність у печінці становила $6,54 \pm 0,62$ нмоль сукцинату на мг білка/ хв. В середині зимівлі вона зменшує свою активність до $4,36 \pm 0,45$ нмоль сукцинату на мг білка/ хв. ($P \leq 0,05$). При зростанні весняної температури і відповідно закінченні терміну голодування в печінці коропа активність сукцинатдегідрогенази зростає та становить вже $8,05 \pm 0,72$ нмоль сукцинату на мг білка/ хв.

Дослідження ферментативної активності в білих м'язах коропа має інший характер. На початку зимівлі її рівень становив $4,58 \pm 0,22$ нмоль сукцинату на мг білка/ хв, що на 30% нижче, ніж в цей період у печінці. Пізніше спостерігається невелике збільшення активності досліджуваного ферменту, і у середині зимівлі він досягає рівня печінки ($4,85 \pm 0,37$ нмоль сукцинату на мг білка/ хв).

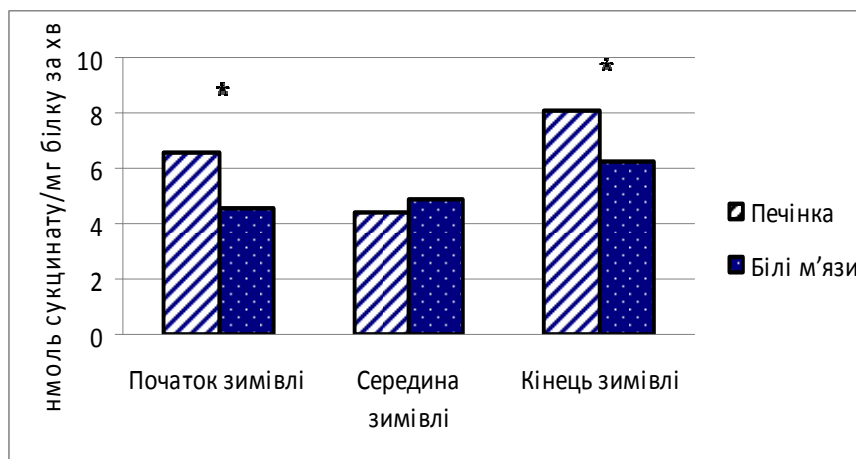


Рис. 1. Активність СДГ-зи в печінці і білих м'язах коропа під час зимівлі ($M \pm m$, $n=10$).

Під час виходу риб із зимівлі було зареєстровано інтенсивне зростання активності СДГ у м'язовій тканині. У березні – квітні її рівень становив $6,24 \pm 0,32$ нмоль сукцинату на мг білка/хв., це на 28% більше, ніж у середині зимівлі, та 36%, ніж на початку зимівлі ($P \leq 0,05$).

В печінці риб, на відміну від білої мускулатури, активність СДГ в цей період найбільша. Необхідно відмітити, що дослідження, проведені на різних прісноводних і морських видах риб показали, що активність СДГ – ключового ферменту циклу Кребса вища у червоній мускулатурі, на відміну від білої [8, 10]. В окремих випадках сукцинатдегідрогеназа у червоних м'язах за рівнем своєї активності практично дорівнює СДГ печінки. Щодо білої мускулатури, то активність даного ферменту не тільки низька, порівняно з червоною мускулатурою і печінкою, а і залежить від сезону, рухливості і статевої зрілості риб [9]. Так, у скорпени, смариди і ставриди сукцинатдегідрогеназна активність інтенсивно зростає лише у переднерестовому і нерестовому періодах. Після нерестового періоду активність цього ферменту знижується до слідових значень. У малорухливих риб таких, як скорпена (*Scorpaena porcus*), СДГ білих м'язів менш активна, ніж у швидкоплаваючої ставриди (*Trachurus mediterraneus ponticus*).

Дослідження сезонної динаміки активності сукцинатдегідрогенази виявило (рис. 1), що вона знаходиться на мінімальному рівні в середині зимівлі. Даний факт можна пояснити процесом голодування. Такий висновок підтверджується тим, що наприклад, в організмі анабаса активність СДГ суттєво зменшується при голодуванні на 44% [6]. Навесні відбувається різке збільшення активності СДГ як у печінці, так і у м'язовій тканині. Причиною зростання активності ферменту може бути підвищення температури навколишнього середовища та більша рухливість риб в пошуках їжі.

При вивченні впливу токсичного середовища, яке містило аміак, на сукцинатдегідрогеназу, були одержані наступні результати (рис. 2). Так, в присутності аміаку у водному середовищі в кількості 2 рибогосподарських ГДК активність ферменту зменшувалась як на початку процесу зимового голодування, так і в кінці його. Восени, в перший етап голодування, за дії токсиканту активність СДГ в печінці коропа знизилась на 55% ($P \leq 0,05$). Водночас у білих м'язах пригнічення активності ферменту відбулось всього на 38%. В середині зимівлі вплив аміаку на активність сукцинатдегідрогенази найменший. Зниження активності відбувається в печінці на 26%, у білій мускулатурі – на 24%. Так, якщо активність ферменту у білих м'язах становила 76% від контролю ($3,70 \pm 0,11$ нмоль сукцината / мг білка за хв. – в

досліді, проти $4,87 \pm 0,39$ нмоль сукцинату / мг білка за хв. – в контролі), то в кінці зимового голодування СДГ активність зменшилась в печінці на 42%, а у білих м'язах – на 52%.

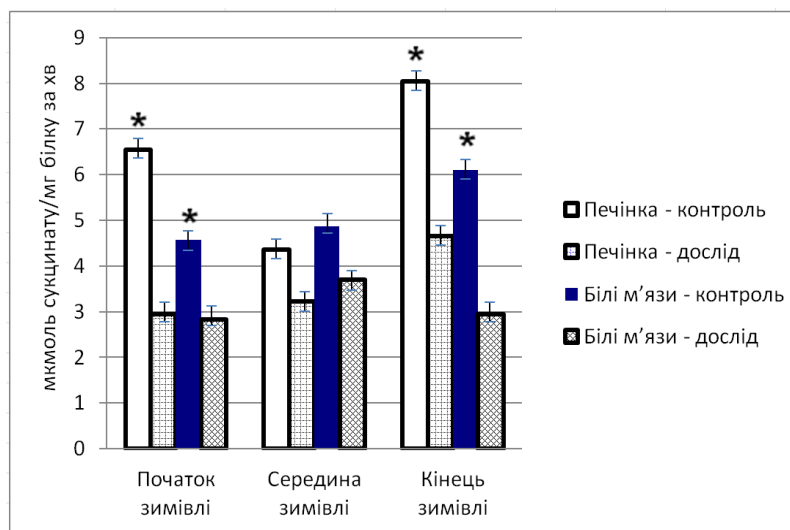


Рис. 2. Дія аміаку на активність СДГ в печінці і білих м'язах коропа.

Примітка * – відмінності вірогідні відносно величини показників контролю.

Дія фенолу на активність сукцинатдегідрогенази, на відміну від аміаку, є протилежною (рис. 3). Збільшення активності досліджуваного ферменту циклу трикарбонових кислот підтвердили загальні пристосування організму до токсичних речовин в період зимового голодування. Мінімальні зміни активності СДГ було зареєстровано в січні – лютому, тобто в той період, коли риби менш активні та не живляться.

В середині зимівлі, як відомо, потреби в енергії у риб мінімальні. Відповідно, водне середовище менш інтенсивно впливає на активність досліджуваних ферментів у печінці і білих м'язах коропа. У березні – квітні, в період виходу риб із зимового голодування, відбувається зростання активності СДГ, як було показано раніше, і дія фенолу має максимальний ефект. Так, в печінці ріст активності ферменту відбувається практично вдвічі – ($14,97 \pm 0,22$ нмоль сукцинату / мг білка за хв. – дослід, проти $8,05 \pm 0,15$ нмоль сукцинату / мг білка за хв. – контроль). Майже в 1,5 раза зростає активність СДГ в білих м'язах.

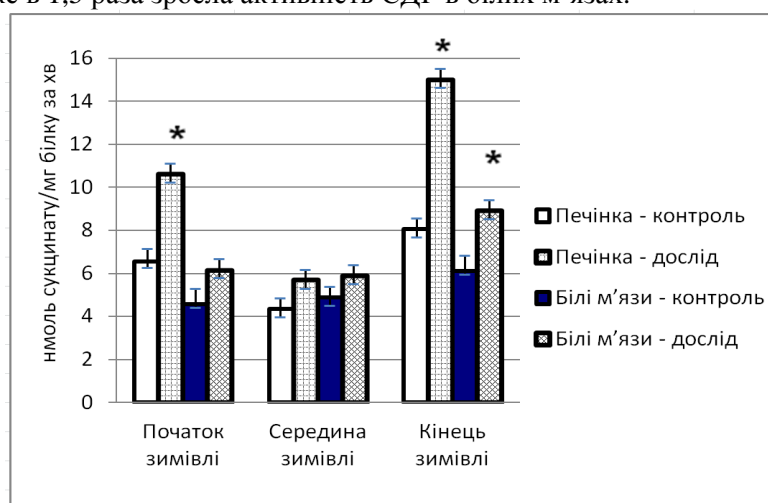


Рис. 3. Активність сукцинатдегідрогенази в печінці і м'язах коропа в період зимового голодування за дії фенолу, нмоль сукцинату / мг білка за хв., ($M \pm m$, $n=5$).

Досліджуючи вплив катіонів Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} та Zn^{2+} на сукцинатдегідрогеназну активність, було встановлено, що вони активізують даний фермент як в печінці, так і в білих м'язах коропа (рис. 4). Максимальні зміни в печінці коропа викликають йони свинцю – активуючи СДГ на 34% ($4,50 \pm 0,00$ нмоль сукцинату /мг білка за 1хв. – контроль, до $6,05 \pm 0,22$ нмоль сукцинату /мг білка за 1 хв. – дослід). Йони міді збільшують активність досліджуваного ферменту на 140%, а манган – на 120%. Незначне зростання активності ферменту за дії йонів мангану та цинку можна пояснити фізіологічною роллю їх як біометалів [4], а катіони Pb^{2+} і Cu^{2+} є більш токсичними для організму риб.

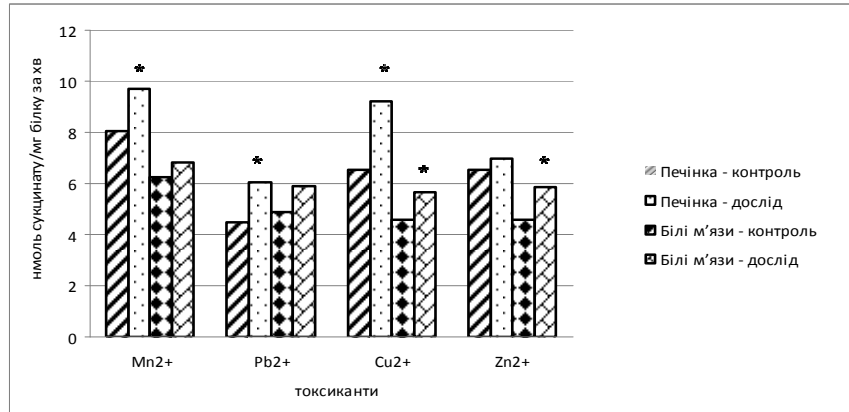


Рис. 4. Дія йонів важких металів на активність СДГ в печінці і білих м'язах коропа, ($M \pm m, n=5$).

У білих м'язах коропа відбуваються схожі зміни – активність сукцинатдегідрогенази теж збільшується, але зміни СДГ в цій тканині менш помітні. Лише йони цинку стимулюють досліджуваний фермент у м'язах більше, ніж у печінці, на 128%.

Аналіз результатів підтвердив загальнофізіологічні уявлення, що можна передбачити вплив сезонного чинника на токсикорезистентність риб. Токсичний вплив фенолу, аміаку визначається періодом зимового голодування риб. У грудні – січні реакція-відповідь організму (у формі змін активності ферменту) на дію стрес-чинника мінімальні. Йони важких металів, які знаходились у водному середовищі в кількості 2 рибогосподарських ГДК, викликали зростання в печінці та білих м'язах коропа активність сукцинатдегідрогенази – 20-40%, стимулюючи процес ЦТК. Досліджуючи дію токсикантів на активність ферментів у різні періоди зимового голодування, можна дійти висновку про те, що у весняний період, коли риби виснажені тривалим голодуванням, відбуваються найбільші зміни активності ферментів енергозабезпечення. Ймовірно, що це викликано підняттям температури навколишнього середовища.

1. *Беспамятнов Г. П.* Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. Справочник / Беспамятнов Г.П., Кротов Ю.А. — Ленинград: Химия, 1985. — 304 с.
2. *Грубинко В. В.* Физиолого-биохимический критерии токсичности среды для рыб/ В. В. Грубинко // Сучасні проблеми теоретичної та практичної іхтіології: матеріали VI Міжнародної іхтіологічної науково-практичної конференції (Тернопіль, 9-12 жовтня 2013р.). за заг. ред. Грубінко В. В. — Тернопіль: Вектор, 2013. — С. 70—75.
3. *Методы биохимических исследований* [Под ред. Прохоровой Л.Г.]. — Л.: ЛГУ. — 1982. — 270 с.
4. *Никоноров А. М.* Биомониторинг тяжелых металлов в пресноводных экосистемах / А. М. Никоноров, А. В. Жулидов, А. Д. Покаржевский. — Л.: Гидрометиздат, 1985. — 144 с.
5. *Руднева И. И.* Использование биомаркеров рыб для оценки экологического состояния морских акваторий / И.И. Руднева // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. — 2013. — № 2 (55). — С. 68—73.
6. *Тканевый обмен у рыб* / [Беляев В.И., Николаев В.М., Шульман Т.Е., Юнева Т.В.]. — К.: Наукова думка, 1983. — 155 с.
7. *Хочачка П.* Биохимическая адаптация / П. Хочачка, Дж. Сомеро. — Москва: Мир, 1988. — 568 с.
8. *Шульман Г. Е.* Физиолого-биохимические аспекты энергетического обмена у рыб / Г. Е. Шульман, Г. А. Финенко // Биоэнергетика гидробионтов. — К.: Наукова думка, 1990. — С.189—220.

9. Эмеретли И. В. Зависимость активности ферментов энергетического обмена у черноморских рыб от температуры в различные периоды годового цикла / И. В. Эмеретли // Вопросы ихтиологии. — 1994. — Т. 34, № 3. — С. 395—399.
10. Эмеретли И. В. Температурная зависимость активности сукцинатдегидрогеназы в митохондриях тканей черноморских рыб / И. В. Эмеретли // Гидробиол. журн. — 1994. — 30, № 6. — С. 64—69.
11. *Biochemica information*. — W. — Germany: BoehringerMannheim GmbH, Biochemica, 1975. — Bd. 1. — P. 99—100.

В. А. Коваль

Черниговский национальный педагогический университет имени Т. Г. Шевченко

**СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ТКАНЯХ КАРПА В УСЛОВИЯХ
ЗИМНЕГО ГОЛОДАНИЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ ТОКСИКАНТОВ РАЗНОЙ
ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ**

Исследована активность сукцинатдегидрогеназы в печени и белых мышцах карпа при повышенной концентрации фенола, ионов тяжелых металлов (Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), аммиака, что соответствует 2 рыбохозяйственным ПДК. Установлено, что изменения исследуемого показателя зависит не только от природы токсиканта, но и от сезона зимнего голодания.

Ключевые слова: сукцинатдегидрогеназа, карп, фенол, ионы тяжелых металлов, аммиак, зимнее голодание

V. A. Koval

T. G. Shevchenko Chernihiv National Pedagogical University, Ukraine

**THE SUCCINATEDEHYDROGENASE ACTIVITY IN THE CARP'S FABRICS IN THE
CONDITIONS OF WINTER STARVATION UNDER THE INFLUENCE OF TOXINS OF
DIFFERENT CHEMICAL NATURE**

The results of the experimental study of the succinate dehydrogenase activity in the carp's (*Cyprinus caprio* L.) liver and white muscles at a high concentration of phenol, the ions of heavy metals (Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), ammonium in different periods of winter starvation have been represented in the article. The required concentration of toxicants in water, corresponding to two maximum allowable fish-farming concentrations, was created by bringing phenol, the corresponding salts $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $Pb(NO_3)_2$ and a buffer mixture of $NH_4OH + NH_4Cl$ in. The research showed that the activity of the phenol studied varies in the scaled carp's liver and muscles in the process of winter starvation greatly due to the influence of the temperature. So the activity of the liver succinate dehydrogenase in the middle of hibernation is reduced by 33%, and at the end of winter starvation increases by 23% compared with the beginning of hibernation. The increase of the enzyme activity in the carp's muscle tissue is also observed in March – April. It indicates that in spring the intensity of the process of the TAC (tricarboxylic acid cycle) is connected with the mobilization of internal reserves caused by raising the temperature of the environment.

While studying the toxic effect of the medium containing phenol the following results have been gained. Thus, in the presence of phenol in an aquatic medium in an amount of 2 maximum allowable fish-farming concentrations the enzyme activity was increasing both at the beginning of winter starvation and at the end of it. In December and January the body's response (in the form of the enzyme activity change) to the stress factor effect is minimal. In spring the changes of the succinate dehydrogenase activity in fish's organisms caused by phenol are maximum: in the liver the enzyme activity increases almost in two times, and in white muscle SDH the activity has increased by nearly 1.5 times. In the studies conducted at toxic ammonia loading, it was found that the pollutant, which is an exometabolite of fish, suppresses the succinate dehydrogenase activity both at the beginning of the process of winter starvation and at the end of it. In autumn (the first stage of starvation) at the toxicant actions the activity of SDH in the carp's liver decreased by 55%. At the same time in white muscles the decreasing of the enzyme activity was only 38%. In the middle of wintering the effect of ammonia on the succinate dehydrogenase activity is the lowest. The decrease of the activity in the liver is 26%,