

УДК: (546.39:597):591.526

Ю. О. Коваленко

ФІЗИОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ АДАПТАЦІЇ КАРАСЯ СРІБЛЯСТОГО ДО ЗАБРУДНЕННЯ ВОДОЙМ АМОНІЙНИМ АЗОТОМ

Вивчено особливості пристосування карася сріблястого до забруднення водойм амонійним азотом за різної тривалості. Реакції риб досліджували за зміною активності лактатдегідрогенази, сукцианатдегідрогенази, Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатази, НАДФ-залежної глутаматдегідрогенази, аланін- і аспартатамінотрансфераз. При довготривалій (впродовж декількох поколінь) адаптації особини відрізняються збільшеною активністю ферментів енергетичного обміну у м'язах, печінці і зябрах. Активність аланін- і аспартатамінотрансфераз у печінці зростає при різній тривалості адаптації.

Ключові слова: карась, адаптація, активність ферментів, амонійний азот, тривалість адаптації.

Стабільність структури іхтіофауни зазвичай залежить від гідрологічних та гідрохімічних параметрів навколишнього середовища. Водойми, розташовані у містах і прилеглих до них територіях, зазнають особливо негативного антропогенного впливу, вони стають накопичувачами різних речовин, у тому числі і токсичних, які безпосередньо впливають на життєдіяльність гідробіонтів. Характер і ступінь їх впливу може бути визначений за низкою фізіологічних і біохімічних показників, які залежать від конкретних умов середовища [10]. Нестабільність умов існування призводить до адаптивних реакцій у риб на біохімічному рівні, а нездатність пристосуватися до діючих чинників може призвести до летальних наслідків.

Серед показників, які характеризують адаптивні реакції водних тварин на дію несприятливих чинників, зокрема підвищеної концентрації амонійного азоту, є зміна активності ферментів енергетичного і азотного обміну. Оскільки ферменти є каталізаторами всіх метаболічних реакцій, то їх активність безпосередньо вказує на фізіологічний стан організму [9, 13]. За дії сполук азоту у риб істотно змінюється азотний обмін, який можна оцінити за активністю його ключових ферментів, зокрема глутаматдегідрогенази (ГДГ), аспартатамінотрансферази (АсАТ) та аланінамінотрансферази (АлАТ). Зокрема, зміни в активності амінотрансфераз вказують на низку порушень функціонування клітин печінки, нирок, серця, м'язів та зябер, що пов'язано з руйнуванням клітин цих органів [3, 21].

© Ю. О. Коваленко, 2019

Метою роботи було встановити зміни активності ферментів енергетичного та азотного обміну риб за дії надмірних концентрацій амонійного азоту різної тривалості.

Матеріал і методика досліджень. Дослідження проводили на Білоцерківській експериментальній гідробіологічній станції Інституту гідробіології НАН України. Об'єктом дослідження були чотири групи самок карася сріблястого (*Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1782)) віком 2—4 роки. Перша (контрольна) група риб постійно знаходилась в водоймі з оптимальною концентрацією сполук азоту. Друга група риб була адаптована до надмірної концентрації амонійного азоту впродовж трьох місяців. Третя група мешкала у водоймі з надмірною концентрацією йонів амонію впродовж трьох років, а четверта перебувала у забрудненому середовищі впродовж декількох поколінь.

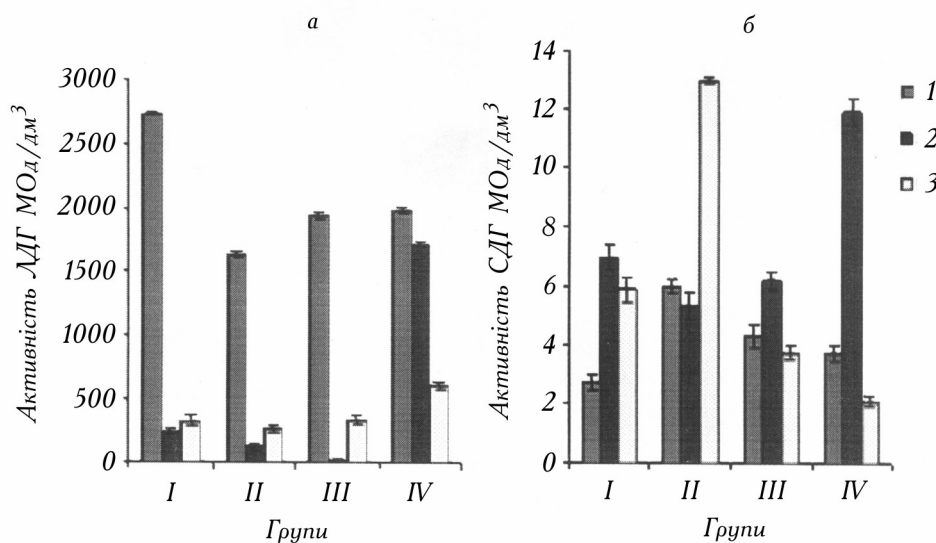
Дослідні водойми характеризувались наступним вмістом йонів амонію: 1-а (контроль) — 2,5 мг N/дм³, 2-а — 24, 3-я — 24,3 і 4-а — 48 мг N/дм³. Зростання рН і температури води призводить до зростання вмісту нейонізованого аміаку по відношенню до загального амонію у воді, що посилює токсичну дію неорганічних сполук азоту на організм риб [17]. Так, температура у водоймах у період досліджень становила відповідно 26—29°C, 24—26,5°C, 24—26°C і 23—26°C, а водневий показник (рН) — відповідно 8,80, 8,12, 8,19 і 8,23. Таким чином, розрахункова концентрація аміаку під час досліджень становила у 1-й водоймі — 0,65 мг N/дм³, 2-й — 5,76 3-й — 5,8, 3 і 4-й — 11,52 мг N/дм³. Вміст амонійного азоту встановлювали фотометричним методом з використанням реактиву Неслера [7].

Відлов риб здійснювали гачковими знаряддями лову та неводом. Активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) встановлювали з використанням стандартного набору «ЛДГ» (Філісіт-Діагностика, Україна), сукцинатдегідрогенази (СДГ) — за [5]. Активність Na⁺/K⁺-аденозинтрифосфатази (АТФ) визначали за наростанням вмісту неорганічного фосфору на СФ-26 [14]. Активність аланін- та аспартатамінотрансферази встановлювали за [6], а НАДФ-залежної глутаматдегідрогенази (ГДГ) — за [2]. Отримані результати статистично обробляли з використанням програм Statistica.10 та Exel із пакету Microsoft Office.

Результати досліджень та їх обговорення

Активність ЛДГ у м'язах риб 2-ї, 3-ї і 4-ї дослідних груп була відповідно на 41, 30 і 28% нижче, ніж у контролі. Таким чином, зі збільшенням часу адаптації риб до надмірного забруднення йонами амонію активність ЛДГ у м'язах знижується, адже риби меншою мірою задіють гліколіз для енергетичного забезпечення гомеостазу.

У той же час у особин 4-ї групи у функціонально активних органах, які задіяні у процесах детоксикації сполук азоту, активність ЛДГ була вищою — у зябрах в 1,36, а у печінці — у 7 раз (рис. 1). Риби з тривалою адаптацією до амонійного азоту активно застосовують гліколіз для енергопостачання зябер і печінки для детоксикації і виведення амонію.

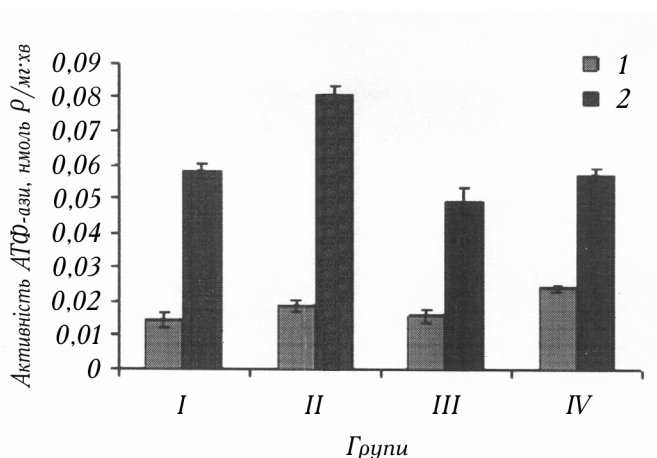


1. Активність лактатдегідрогенази (а) і сукцинатдегідрогенази (б) у м'язах (1), зябрах (2) і печінці (3) карася при адаптації до надлишку амонію. Тут і на рис. 2—4: I—IV — відповідно 1—4-а дослідні групи; $M \pm m, n = 5$.

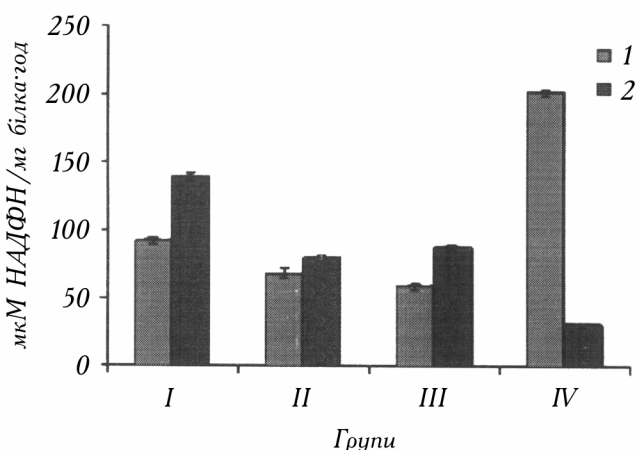
Активність СДГ у м'язах особин 2-ї, 3-ї і 4-ї груп була відповідно на 55, 38 і 28% вищою, ніж у контрольній. Також контрольні значення були перевищені у печінці особин 2-ї групи (у 2,2 разу) і зябрах особин 4-ї (в 1,72 разу). Вища активність цього ферменту свідчить про посилення функціонування циклу Кребса, що пов'язано зі зростанням енергетичних затрат на підтримання гомеостазу [18]. Це може свідчити про розвиток резистентності організму до умов навколишнього середовища. У той же час у особин 3-ї групи активність СДГ у печінці була в 1,56 разу, а у особин 4-ї — у 2,7 разу нижчою за контрольну. У зябрах особин 2-ї групи активність ферменту була на 23% нижчою контрольних значень, а 3-ї — лише на 11% (рис. 1). Це може вказувати на те, що сукцинат не окислюється до фумарату, у результаті чого порушується функціонування циклу Кребса.

Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатаза бере активну участь у процесах осмотичної та йонної регуляції клітин. Крім того, цей фермент створює мембранний градієнт, який забезпечує перенесення різних метаболітів, у тому числі цукрів та амінокислот через клітинну мембрану [11].

У зябрах карася 2-ї групи активність АТФ-ази перевищувала контроль на 28% (рис. 2), що може свідчити про активацію йонообмінних і обмінних процесів у зябрових пелюстках, спрямованих на підтримку йонного обміну у мембрані [9, 17, 19]. У особин 3-ї і 4-ї груп активність цього ферменту близька до контролю, що вказує на успішне пристосування риб до надмірного надходження амонійного азоту у водойму. Активність АТФази у м'язах особин різних груп змінювалася у незначних межах, хоча при максимальній концентрації йонів амонію вона була дещо вищою (див. рис. 2).



2. Активність аденозинтрифосфатази у м'язах (1) і зябрах (2) карася при адаптації до надлишку амонію.



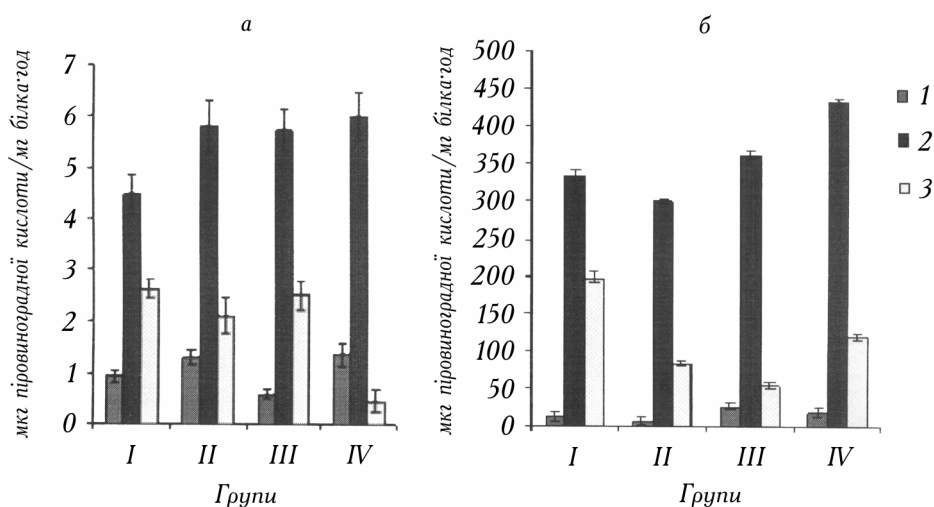
3. Активність глутаматдегідрогенази у зябрах (1) і печінці (2) карася при адаптації до надлишку амонію.

Глутаматдегідрогеназа (ГДГ) — мітохондріальний фермент, що каталізує перетворення глутамінової кислоти в α-кетоглутарову та аміак, а також бере участь у обміні амінокислот. Найбільша його кількість міститься у клітинах печінки. ГДГ перебуває всередині мітохондрій гепатоцитів, тому збільшення її активності спостерігається насамперед при важких ураженнях печінки [21].

Активність ГДГ у зябрах і печінці карася 2-ї групи була відповідно в 1,25 і 1,60 разу, а у 3-й групі — відповідно в 1,35 і 1,75 разу нижчою, ніж у контролі. У той же час у особин 4-ї групи активність цього ферменту у зябрах була у 2,2 рази вищою, а у печінці — у 4,5 разу нижчою (рис. 3). Відомо, що транспорт екзогенного та ендогенного аміаку відбувається саме через зябра [17]. Таким

чином, при тривалій адаптації риб до токсичного навантаження зябра виконують основну функцію з екскреції надлишкового амонію з організму, а печінка задіяна меншою мірою.

Іншими ферментами, що відіграють важливу роль в обміні білків, є ферменти трансамінування [21]. Зміни в активності амінотрансфераз вказують на низку порушень функціонування клітин печінки, нирок, серця, м'язів та зябер [24], також їх пов'язують із руйнуванням клітин цих органів [13, 21]. Аланін- (АЛАТ) і аспартатамінотрансфераза (АсАТ) беруть участь у обміні



4. Активність АсАТ (а) і АлАТ (б) у м'язах (1), печінці (2) і зябрах (3) карася при адаптації до надлишку амонію.

амінокислот і переважно знаходяться у печінці [4]. Активність АлАТ зростає при порушенні внутрішньої структури гепатоцитів і підвищенні проникності їх мембран. АлАТ вважають індикаторним ферментом порушень функцій цього органу будь-якої природи [16]. Загалом, АсАТ та АлАТ за своєю дією схожі між собою і відіграють ключову роль у білковому обміні [1], проте АлАТ локалізується у цитоплазмі, а АсАТ — у мітохондріях. При ураженні печінки АсАТ активізується меншою мірою, ніж АлАТ. Найвищу активність ферментів відмічено у тканинах печінки, серця і скелетних м'язах [22, 23]. Значне зниження активності АсАТ вказує на важке ураження гепатоцитів [20].

У зябрах особин 4-ї групи активність АсАТ була у 5,6 разу нижчою, ніж у контролі, а у печінці і м'язах — відповідно у 1,25 і 1,33 рази вищою. У м'язах риб 2-ї групи її активність перевищувала контроль в 1,33, а третьої була в 1,35 разу нижчою (рис. 4). Активність АлАТ у зябрах риб 2-ї, 3-ї і 4-ї дослідних груп була відповідно у 2,3, 3,6 і 1,6 разу нижчою за контрольну. У печінці особин 4-ї групи її активність була в 1,23 разу вищою (див. рис. 4).

Зниження активності АсАТ та АлАТ відбувається при багатьох гострих ураженнях печінки [12], при цьому пригнічується синтез низки ферментів [3]. Для подолання напруженого енергетичного обміну за дії високої концентрації амонійного азоту завдяки зростанню активності ЛДГ у печінці посилюються процеси гліколізу. Зростання активності АсАТ у білих м'язах може вказувати на інтенсивні процеси катаболізму запасних білків в них. Висока активність АсАТ і АлАТ у зябрах свідчить про адаптивні зміни у функціонуванні зябрових пелюсток при надмірному токсичному навантаженні.

Висновки

При короткотривалій адаптації до дії амонійного азоту у зябрах карася активність ЛДГ знижується на 20%, проте зі збільшенням тривалості адаптивних процесів вона зростає на 47% порівняно з контролем, що може бути пов'язано із нестачею кисню у клітинах респіраторного апарату риб і призводити до змін функціонального стану в цих клітинах. Активність СДГ у м'язах риб при короткотривалій адаптації зростає на 55%, проте зі збільшенням часу адаптації вона наближається до контрольних значень. У печінці при короткостроковій адаптації активність СДГ збільшується у на 56%, а при більш тривалій — зменшується у 2,7 рази відносно контролю, що свідчить про стабілізацію енергетичного забезпечення у білих м'язах і печінці.

При короткотривалій адаптації у зябрах риб активність також зростає активність АТФ (на 28%), але зі збільшенням часу вона знижується до контрольних значень, що свідчить про резистентність зябрового апарату до впливу амонійного азоту. Активність ГДГ у печінці особин всіх дослідних груп знижується, що вказує на те, що вона ймовірно не брала участі у процесах детоксикації. У зябрах при короткотривалій адаптації її активність також знижується, проте при довготривалій вона зростає, адже зябра безпосередньо контактують з оточуючим середовищем і беруть участь у виведенні аміаку з організму.

Активність амінотрансфераз вказує на перехід білкового обміну на інший рівень адаптації, адже у печінці активність АсАТ залишається високою, а АлАТ — зростає до 23%. У той же час у зябрах активність амінотрансфераз знижується вже через 3 місяці адаптації, що свідчить про пластичність цього органу.

**

Изучены особенности адаптации карася серебрястого к загрязнению аммонийным азотом разной длительности. Реакции рыб изучали по изменению активности лактатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатазы, НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназы, аланин- и аспаратаминотрансферазы. После долговременной (в течение нескольких поколений) адаптации возрастает активность ферментов энергетического обмена в мышцах, печени и жабрах. Активность аланин- и аспаратаминотрансферазы возрастает в печени особей всех опытных групп.

**

The features of crucian carp adaptation to contamination by ammonium nitrogen for different time intervals were studied. The fish reaction was studied by changes of activity of lactate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, Na^+/K^+ -adenosine triphosphatase, NADP-dependent glutamate dehydrogenase, alanine and aspartate aminotransferases. The long-term (over some generations) adaptation result in activation of the energy metabolism enzymes in muscles, liver and gills. Activity of alanine and aspartate aminotransferase was registered in liver of specimens of all three experimental groups.

**

1. Гулиев Р. А., Мелякина Э. И. Некоторые биохимические показатели крови рыб дельты Волги // Вестник АГТУ. Сер. Рыб. хоз-во. — 2014. — № 2. — С. 85—91.
2. Захарова Л.И. Определение активности глутаматдегидрогеназы в митохондриях тканей животных // Методы биохимических исследований. — Ленинград, 1982. — С. 250—252.
3. Красюк Ю.М. Вміст аміаку і нітритів в тканинах риб за тривалої дії сполук неорганічного азоту // Наук. записки Терноп. пед. ун-ту. Сер. Біол. — 2011. — № 2. — С. 198—201.
4. Лобойко Ю.В., Барило Б.С., Крушельницька О.В. Визначення активності амінотрансфераз у тканинах одnorічок коропа за інвазії ектопаразитами // Наук. вісник ЛНУВМБ. — 2017. — № 79. — С. 17—21.
5. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). — Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. — 272 с.
6. Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований / под ред. проф. В.В. Меньшикова. — Ленинград, 1973. — 324 с.
7. Методика выполнения измерений массовой концентрации аммонийного азота с реактивом Несслера фотометрическим методом в сточных водах // С Петербург: Центр исследования и контроля воды, 2001. — 12 с.
8. Марценюк В. М., Потрохов О.С., Зінковський О.Г. Адаптивна біохімічна відповідь коропа та окуня на дію підвищеного температурного режиму води // Наук. зап. Терноп. пед. ун-ту. Сер. Біол. — 2017. — № 1. — С. 83—89.
9. Потрохов О.С. Фізіолого-біохімічні механізми адаптації риб до змін екологічних чинників водного середовища: Автореф. дис. ... докт. біол. наук. — К., 2011. — 44 с.
10. Потрохов О. С. Сезонні зміни загальних біохімічних показників коропів під впливом сполук алохтонного азоту // Рибогосп. наука України. — 2010. — № 2. — С. 72—79.
11. Причепя М. В. Активність лактатдегідрогенази та загальної АТФ-ази як показник екологічної пластичності окуневих риб за умов погіршення кисневого режиму // Проблеми функціонування та підвищення біопродуктивності водних екосистем. Мат. міжнар. наук.-практ. дистанційної конф. — Київ, 2014. — С. 142—145.
12. Рощина О.В. Применение сывороточных аминотрансфераз рыб для оценки экологического состояния акваторий // Материалы междунар. науч. конф. «Современные проблемы гидробиологии. Перспективы, пути и методы решений». — Херсон, 2008. — С. 374—378.
13. Ciardiello M.A., Camardella L., Carratore V., Prisco G. L-Glutamate dehydrogenase from the antarctic fish *Chaenocephalus aceratus*. Primary structure, function and thermodynamic characterisation: relationship with cold adaptation // Biochim. Biophys. Acta. — 2000. — № 1. — P. 11—23.
14. Fiske C.H., Subbarow Y.J. The colorimetric estimation of phosphorous // Biol. Chem. — 1925. — Vol. 66. — P. 375.

15. Johnston I.A. Molecular mechanisms of temperature adaptation in fish myofibrillar adenosine triphosphatases // J. Comp. Physiol. — Vol. 119, N 2. — P. 195—206.
16. Kostiuk K.V., Grubinko V.V., Khomenchuk O.V., Arsan O.M. Functioning of adenosine triphosphatases in gills of carp (*Cyprinus carpio*) under the impact of oil products // Hydrobiol. J. — 2010. — Vol. 46, N 3. — P. 86—91.
17. Manuel G.M., Molina A.Z. Transaminasas: Valoración y significación clínica // SEGHNPA-AEP. — 2010. — P. 267—275.
18. Manoj C.K. Hematobiochemical and histopathological studies in *Labeo rohita* (HAM.) infected with *Aeromonas hydrophila* by immersion challenge // Diss. submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of M.F.Sc. (Fish Pathology and Microbiology). — Wisconsin, 2003. — P. 57—59.
19. Nicolas M.A., Rueda Gonzalez F., Martinez Lopez F.J. Efecto de la realimentación tras un periodo de ayuno sobre el crecimiento en el sargo picudo *Diplodus puntazzo* (Cetti,1777) // Bol. Inst. Esp. Oceanogr. — 2002. — Vol. 18, N 1—4. — P. 357—362.
20. Nilson G. E., Renshaw G.E. Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral—reef shark // J. Exp. Biol. — 2004. — Vol. 18. — P. 331—339.
21. Romanenko V.D., Potrokhov O.S., Zinkovskiy O.G. Physiological-biochemical peculiarities of ammonia content regulation in carp // Hydrobiol. J. — 2010. — Vol. 46, N 1. — P. 56—63.
22. Varadarajan R., Sankar H., Jisha J., Babu P. Sublethal effects of phenolic compounds on biochemical, histological and ionoregulatory parameters in a tropical teleost fish *Oreochromis mossambicus* (Peters) // Int. J. Sci. Res. Publ. — 2014. — Vol. 4, N 3. — P. 1—12.
23. Wang Y.H., Chien Y.H., Pan C.H. Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation, and antioxidant capacity of characins, *Hyphessobrycon callistus* // Aquaculture. — 2006. — Vol. 261, N 2. — P. 641—648.
24. Wedemeyer G.A. Physiology of fish in intensive culture systems. — Springer Science & Business Media, 1996. — 232 p.