

УДК 577.112.3: 591.41.1/597.554,3+570.42/048

**ДИНАМІКА ВМІСТУ АМІНОКИСЛОТ В МОЗКУ РИБ ПРИ ДІЇ
ЕКСТРЕМАЛЬНИХ ФАКТОРІВ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА**

ЖИДЕНКО А.О., ГРУБІНКО В.В., ЖИДЕНКО В.В., ПУГАЧ Л.В.

Вільні амінокислоти відіграють суттєву роль в діяльності нервової системи [7, 10]. Вони утворюють резерви азоту, які забезпечують синтез білків і нуклеїнових кислот. Деякі з них включаються в енергетичний метаболізм, використовуються для детоксикації аміаку, а також є субстратами утворення нейромедіаторів [2, 3, 11, 16].

У риб добре вивчені амінокислотні резерви м'язів та печінки і їх перебудова при стрес реакціях, пов'язаних з зимовим голодуванням, інтоксикаціями, нерестом [5, 11, 13, 16]. Щодо нервової системи риб, то відомі деякі порівняльні дослідження амінокислотного складу мозку риб різних екологічних груп (акула, судак, скат, осетр) в залежності від температури середовища [12], а також аналіз динаміки вмісту нейромедіаторних амінокислот (глутамат, ГАМК) в еволюції пойкилотермних організмів [7]. Однак єдиний комплексний підхід в оцінці функціональної ролі вільних амінокислот в мозку риб відсутній. Між тим, у ссавців встановлена провідна роль амінокислот мозку в адаптації до стрес-факторів [1].

Метою даного дослідження стало вивчення динаміки вмісту вільних амінокислот в мозку риб при різних стрес-діях факторів водного середовища.

Матеріали і методика дослідження. Об'єктом дослідження слугували особини коропа двохрічного віку (n=9).

Сезонну динаміку вмісту вільних амінокислот в тканинах мозку визначали протягом зимівлі з вересня до квітня. Риб

відбирали з природної водойми - зимувального ставка Чернігівського рибкомбінату. Досліди по вивченню впливу різних стрес-факторів проводили в 200-літрових акваріумах з відстояною водопровідною водою, в які рибу розміщували з розрахунку 40 л води на 1 екземпляр. В усіх випадках здійснювали контроль і підтримували постійний гідрохімічний режим води. Величина рН складала $7,3 \pm 0,27$, вміст кисню - $5,6 \pm 0,4$ мг/л, температура втримувалась близькою до природної в залежності від сезону року, в які проводили дослідження. При дослідженні дії аміаку його рівень (0,1 мг/л) створювали внесенням розрахункових кількостей буферної суміші хлориду амонію і гідроксиду амонію, рН 7,6. В контролі його рівень не перевищував 0,014 мг/л. Комплексну дію аміаку та іонів металів (магнію, марганцю, кобальту) досліджували внесенням їх солей у концентраціях 4,52 мМ/л; 10,0 мМ/л; 10 мМ/л відповідно. Гіпоксичні умови (вміст кисню - 2,0-2,5 мг/л) створювали, використовуючи рекомендації Коцар Н.І. та ін. [4]. Середовища з підвищеною (рН 6,4) та зниженою (рН 8,3) кислотністю створювали внесенням розрахункових кількостей соляної кислоти або гідроксиду натрію відповідно.

Аналіз амінокислотного складу здійснювали приготуванням гомогенатів наважок тканини головного мозку у співвідношенні 1:5 (маса:об'єм) в 6% хлорній кислоті, які потім нейтралізували до рН 7,0 0,25М розчином карбонату калію, центрифугували і випаровували досуха. Осад розчиняли в 0,1мл 0,1 н. розчину соляної кислоти. Аліквотні

частини наносили на хроматографічний папір (Ленінградська середня). Висхідне хроматографування проводили в системі розчинників бутанол: оцтова кислота: вода в співвідношенні: 1-й розчинник - 12:3:5 [17], 2-й розчинник - 40:15:5 [9, 17].

Статистичну обробку отриманих даних ви-

конували загальноприйнятими методами з використанням t-критерію Ст'юдента [8].

Результати дослідження і їх обговорення. Сезонна динаміка вільних амінокислот у мозку риб в цілому аналогічна такій в їх м'язах і печінці [13, 16].

Таблиця 1

Сезонна динаміка вмісту амінокислот у мозку коропа (мкмоль/г сухої тканини, $M \pm m$; $n=5$)

Амінокислоти	Вересень	Жовтень	Грудень	Лютий	Квітень
Глутамінова	3,74±0,27	3,52±0,37	1,83±0,13	4,84±0,40	2,47±0,35
Гліцин	-	3,49±0,39	0,61±0,14	4,97±0,63	2,54±0,24
Серин	-	2,33±0,14	0,66±0,05	2,20±0,32	2,27±0,25
Аланін	-	-	-	-	2,82±0,27
Аспарагінова	1,93±0,14	5,05±0,58	0,69±0,09	4,20±0,36	2,25±0,22
Цистеїн+цистин	-	9,56±0,96	1,36±0,16	3,66±0,33	14,3±0,19
Валін	-	-	-	-	0,98±0,02
Лейцин	-	-	-	-	1,13±0,11
ГАМК	0,17±0,03	2,29±0,21	0,64±0,08	0,94±0,09	1,87±0,12

Примітка: "-" - не визначали.

З таблиці видно, що високий рівень вмісту вільних амінокислот має місце в жовтні перед входом риб в зимівлю, що узгоджується з фактом накопичення їх в цей період в усіх тканинах. Найменша їх концентрація виявлена в грудні. При цьому вміст цистеїну та аспарагінової кислоти в 4-7 разів вищий, ніж інших амінокислот. Як раніш було показано і в м'язах та печінці риб [16] наступний значний пік концентрації вільних амінокислот в мозку риб спостерігається у лютому, а вторинне значне зниження - у квітні. Виявлені закономірності узгоджуються з відомою роллю амінокислот риб в енергетичному метаболізмі в умовах зимового голодування. Протягом зимівлі спочатку використовуються вільні амінокислоти м'язів та печінки [16]. Потім протеолізу піддаються "резервні" білки цих органів, які в кінці голодування є для організму єдиним джерелом енергозабезпечення [13], оскільки в цей час уже використані запаси вільних амінокислот і жирів. У мозку риб, очевидно, даний процес також має місце, оскільки в кінці голодування (квітень) вміст загального білка в ньому знижується до

30,58±0,27 мг на 1 г сухої тканини порівняно таким у вересні-жовтні (початок зимівлі) - 47,01±0,34 мг на 1 г сухої тканини. Одержані результати узгоджуються з даними досліджень по вивченню впливу високотемпературного голодування на вміст вільних амінокислот у мозку коропа [20], в якому показано, що протягом 72 годин голодування вміст 7 із 16 амінокислот мозку знижується.

Таким чином, в процесі зимового голодування вільні амінокислоти мозку риб, поряд з білком, можуть бути субстратом для енергозабезпечення. Переважне значення для ендогенного живлення організму риб в зимовий період мають такі амінокислоти як гліцин, цистеїн, серин, аспарагінова і глутамінова кислоти. Дані амінокислоти, як вказується у роботі [22], особливо глутамінова [22], можуть окиснюватися у мозку коропа і карася швидше, ніж глюкоза, і бути важливішим джерелом енергії, ніж вуглеводи.

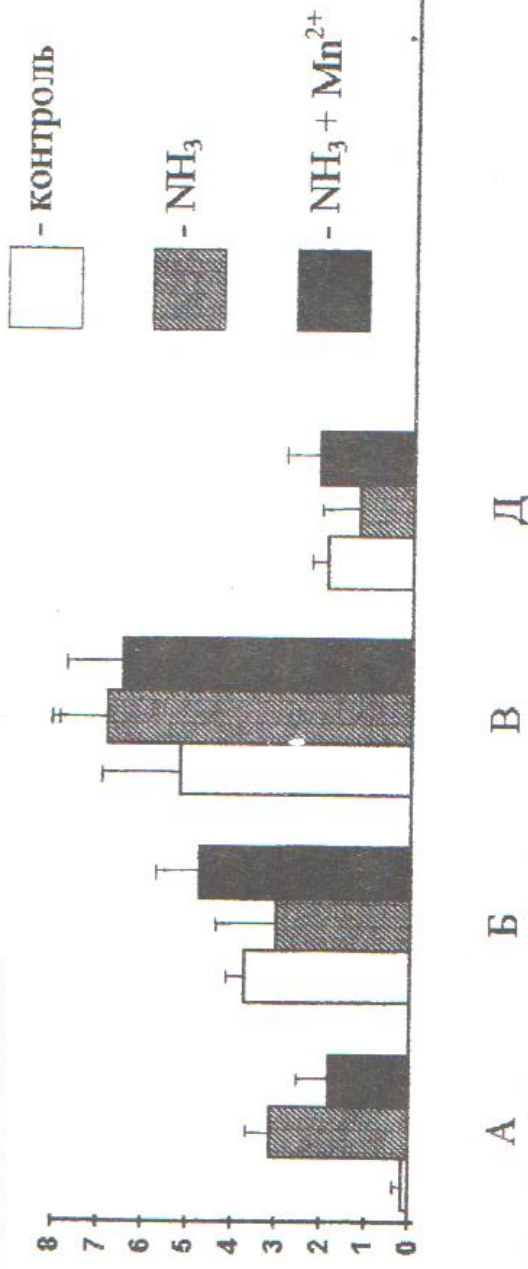
В зв'язку з цим видається цікавим вивчення функційної ролі вільних амінокислот мозку риб в адаптації до інших факторів середовища, в першу чергу токсичних.

Як показали наші дослідження, вміст амінокислот у мозку риб значно змінюється за дії більшості екстремальних факторів середовища. Зокрема, внаслідок екзогенної амонійної інтоксикації відбувається різке збільшення вмісту одних і зменшення інших амінокислот (Рис. 1). Встановлено, що вміст глутамінової кислоти змінюється незначно, хоча тенденція до збільшення її концентрації спостерігається. Це погоджується з відомими фактами про те, що глутамінова кислота є центральною на шляху дисиміляції решти амінокислот в процесі їх дезамінування через глутамат-дегідрогеназну систему [14]. Аналогічна закономірність характерна і для іншої дикарбонової кислоти - аспарагінової, яка приймає участь в трансаміназній реакції. Вміст аланіну у амонізованих риб зростає значніше. Це може свідчити про посилення процесів переамінування як ефективного метаболічного шляху перерозподілу амінокислотних резервів, а також використання аланіну в детоксикації створеного при цьому аміаку. Незначно змінюється вміст серину, ГАМК і гліцину. На відміну від цих амінокислот вміст цистеїну дуже зменшується. Ймовірно, що роль даної амінокислоти у мозку риб специфічна, оскільки і в умовах зимового голодування при високому рівні її вмісту в жовтні також спостерігається значне зниження її концентрації протягом зимівлі. Виявлений ефект може мати місце внаслідок декількох причин. По-перше, відома мембранотропна функція цистеїну, який приймає участь як в адаптивній перебудові структури мембранних білків, так і у синтезі одного з відомих транспортних пептидів мембран - глутатіону [10]. Останній є учасником мембранного транспорту амінокислот, перш за все, глутамінової. Вона, в свою чергу, є одним з нейромедіаторів мозку, а також джерелом для синтезу гама-аміномасляної кислоти [10]. Ймовірність вказаного метаболічного перетворення при аміачному стресі у риб, супроводжуваного накопиченням глутамінової кислоти і

ГАМК, дуже велика. Крім того, зменшення вмісту цистеїну при аміачному токсикозі можливо у зв'язку з його використанням як субстрату в глюконеогенезі, який при даному виді стресу посилюється [2]. Окиснюючись, цистеїн перетворюється в цистеїнову кислоту. При цьому проміжними продуктами окислення є цистеїнсульфенова та цистеїнсульфінова кислоти. Остання шляхом трансамінування з 2-оксоглутаровою кислотою може перетворитись в 3-сульфінілпіровиноградну, а потім в піровиноградну кислоту (ПВК). ПВК, в свою чергу, використовується для біосинтезу глікогену, якщо у мозку достатньо енергетичних субстратів, або підлягає окисному декарбоксилюванню і в вигляді ацетил-СоА використовується в енергетичних цілях [10]. Виходячи з цього, амонійний токсикоз може бути причиною різкого посилення процесів окислення цистеїну. Цей процес метаболічно вигідний миттєво за рахунок існування метаболічного ланцюга: Цис-ПВК-АцетилСоА-енергія, або трохи довше у часі за рахунок ланцюга перетворень: посилення глюконеогенезу-синтез глікогену. Підтвердженням даних висновків є збільшення вмісту глутамінової кислоти. Слід відмітити, що розглянута динаміка вільних амінокислот у мозку риб при аміачному токсикозі характерна для всіх проведених нами дослідів в різні сезони року (Рис. 1а,б,в).

Досліджувана нами спільна дія амонійного токсикозу і іонів деяких металів на вміст вільних амінокислот у мозку риб, показала, що іони марганцю стабілізують амінокислотний статус мозку, створюючи тенденцію до наближення їх рівня порівняно з аміачним токсикозом до контрольних значень. Іони магнію, навпаки, збільшують вміст більшості амінокислот порівняно з їх вмістом при дії аміаку окремо. Вміст цистеїну при цьому практично не змінюється. За дії іонів кобальту характерним є стабілізація вмісту на рівні контрольного для ГАМК, глутамінової і аспарагінової кислот.

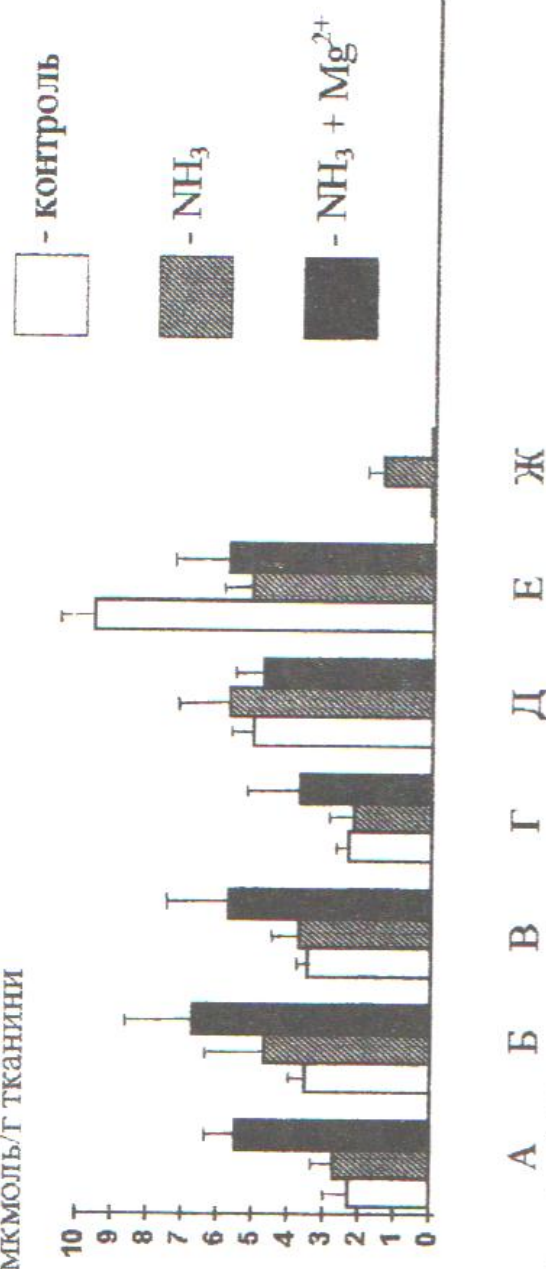
мкмоль/г тканини



А Б В Д

Рис. 1. а) Вплив катіонів марганцю на вміст вільних амінокислот у мозку риби при інтоксикації аміаком.

мкмоль/г тканини



А Б В Г Д Е Ж

Рис. 1. б) Вплив катіонів магнію на вміст вільних амінокислот у мозку риби при інтоксикації аміаком.

Ж - аланін

Рівень гліцину при дії цих іонів збільшується, а цистеїну не змінюється. В цілому, стабілізуючий ефект на вміст вільних амінокислот порівняно з амонізованими рибамі виявляють іони марганцю і кобальту. Іони магнію збільшують пул вільних амінокислот, що з одного боку є сприятливим з точки зору можливості швидкої їх мобілізації в метаболізмі, і в той же час можуть бути засобом виснаження білкового резерву мозку.

Таким чином, дія різних катіонів сумісно з аміаком різноспрямована і вказує як на високу варіабельність вільних амінокислот, так і на можливість корекції ними відхилень при аміачному токсикозі. Друге з практичної точки зору більш цінно, оскільки аміачний токсикоз за даними Лук'яненка В.І. [5] є наслідком любові токсичної дії на організм риб.

В зв'язку з отриманими результатами, було цікавим вивчення впливу на динаміку вільних амінокислот інших абіотичних факторів середовища, а також їх комбінацій з токсичною дією амонійного азоту. Зокрема, нами досліджено вплив аміаку на фоні гіпоксії. Вибір даного варіанту пов'язаний з тим, що в гіпоксичних умовах в організмі риб завдяки активації гліколітичного шляху вироблення енергії для нейтралізації утвореної при цьому молочної кислоти за рахунок катаболізму вільних амінокислот інтенсивно продукується аміак [6]. Як виходить із даних, наведених на рис. 2, при гіпоксії вміст вільних амінокислот переважно знижується. Значно знижується рівень нейромедіаторних амінокислот - ГАМК і глутамату, а також аспарагінової кислоти і цистеїну. Менше змінюється вміст гліцину. Щодо серину, то його концентрація практично не змінюється, а аланіну дещо підвищується. Тенденція до зменшення вмісту амінокислот підвищується за комбінованої дії гіпоксії і аміаку в токсичній концентрації. Отримані дані підтверджують відоме для гіпоксичного стану пойкилотермних організмів явище інтенсивного використання амінокислот в анаеробному енергетичному метаболізмі, яке

раніше широко описане для м'язів і печінки риб [15, 23]. Ймовірно, аналогічні реакції анаеробного катаболізму амінокислот протікають і в мозку риб. Аміак, очевидно, посилює цей процес, бо для нього характерно індукування гіпоксії у риб у зв'язку з порушенням кисень-транспортних функцій у зябрах [21].

На відміну від виявлених закономірностей динаміка вільних амінокислот мозку коропа, аклімованого в воді з екстремально низьким (6,4) та високим (8,3) значенням рН (при більш низьких та більш високих значеннях рН спостерігалась загибель риб протягом двох годин) протилежна (Рис. 3). Як закислення, так і залуження середовища викликає збільшення вмісту вільних амінокислот у мозку. При цьому рівень глутамінової кислоти збільшується у 5 разів у кислому середовищі та у 8 разів в лужному. Вміст серину і гліцину в середньому збільшується в 3 рази в першому і в 4,8 в другому випадку. Концентрація аспарагінової кислоти і цистеїну збільшується відповідно в 1,5 і 2,0 рази. Збільшується також вміст фенілаланіну. В кислому середовищі відмічено зниження рівня тільки для аланіну, а в лужному - він практично рівний контрольному. Таким чином, отримані дані підтверджують наявність у коропа при аклімації до порогових рН відомого метаболічного стрес-синдрому - протеолізу білків. Роль вільних амінокислот в даному випадку може зводитися до виконання кількох функцій. По-перше, можлива їх участь у анаеробному енергетичному метаболізмі, бо за даними [18] зниження рН до 5,0 і підвищення до 10,0 у тільпії (*Tilapia massambica*) посилює гліколітичні процеси і глюконеогенез, в яких у риб амінокислоти використовуються достатньо інтенсивно. По-друге, амінокислоти, особливо ті, які мають добре дисоціюючі реактивні радикали, можуть формувати буферні системи з високою буферною ємністю. У випадку відхилення рН така участь може посилюватися, і тому збільшення концентрації вільних амінокислот може бути компенсаторним механізмом підтримання кислотно-

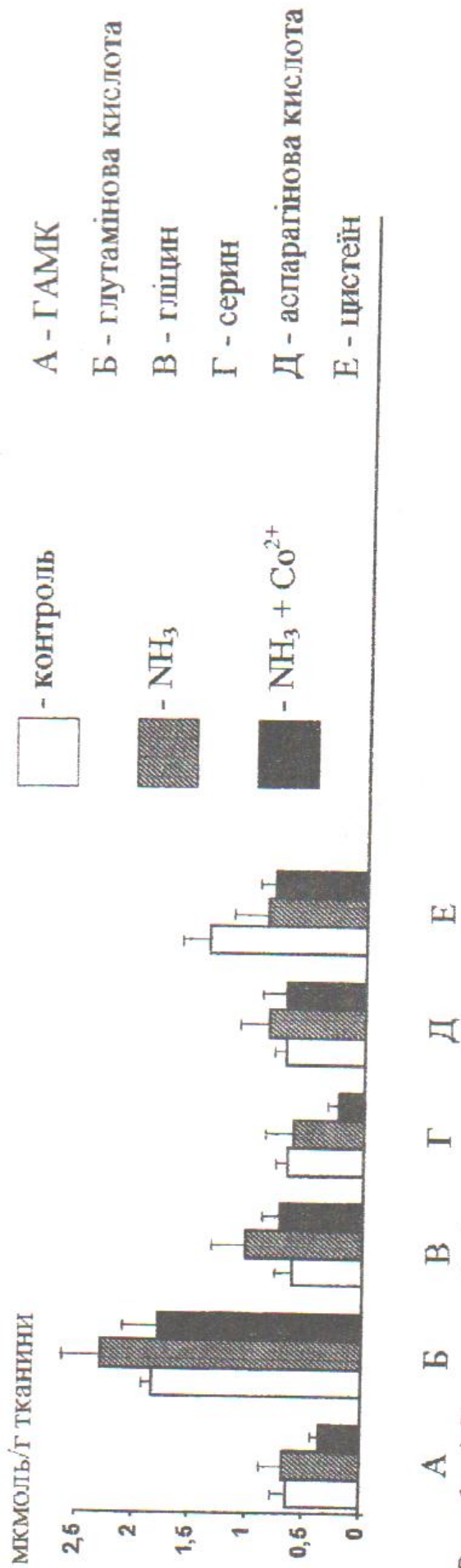


Рис. 1. в) Вплив катіонів кобальту на вміст вільних амінокислот у мозку риби при інтоксикації аміаком.

мкмоль/г тканини

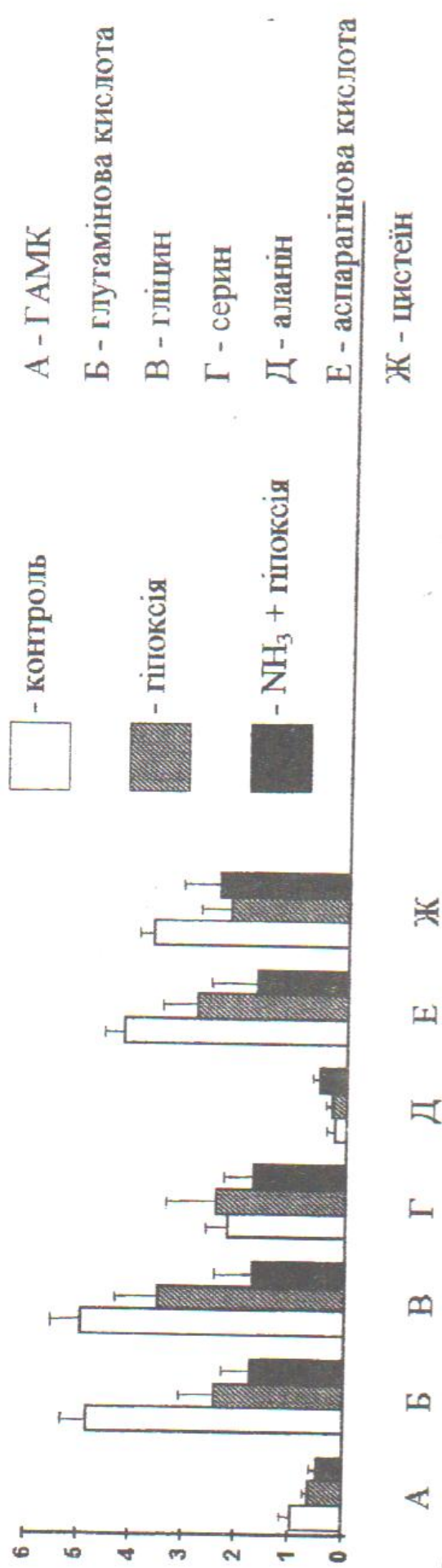
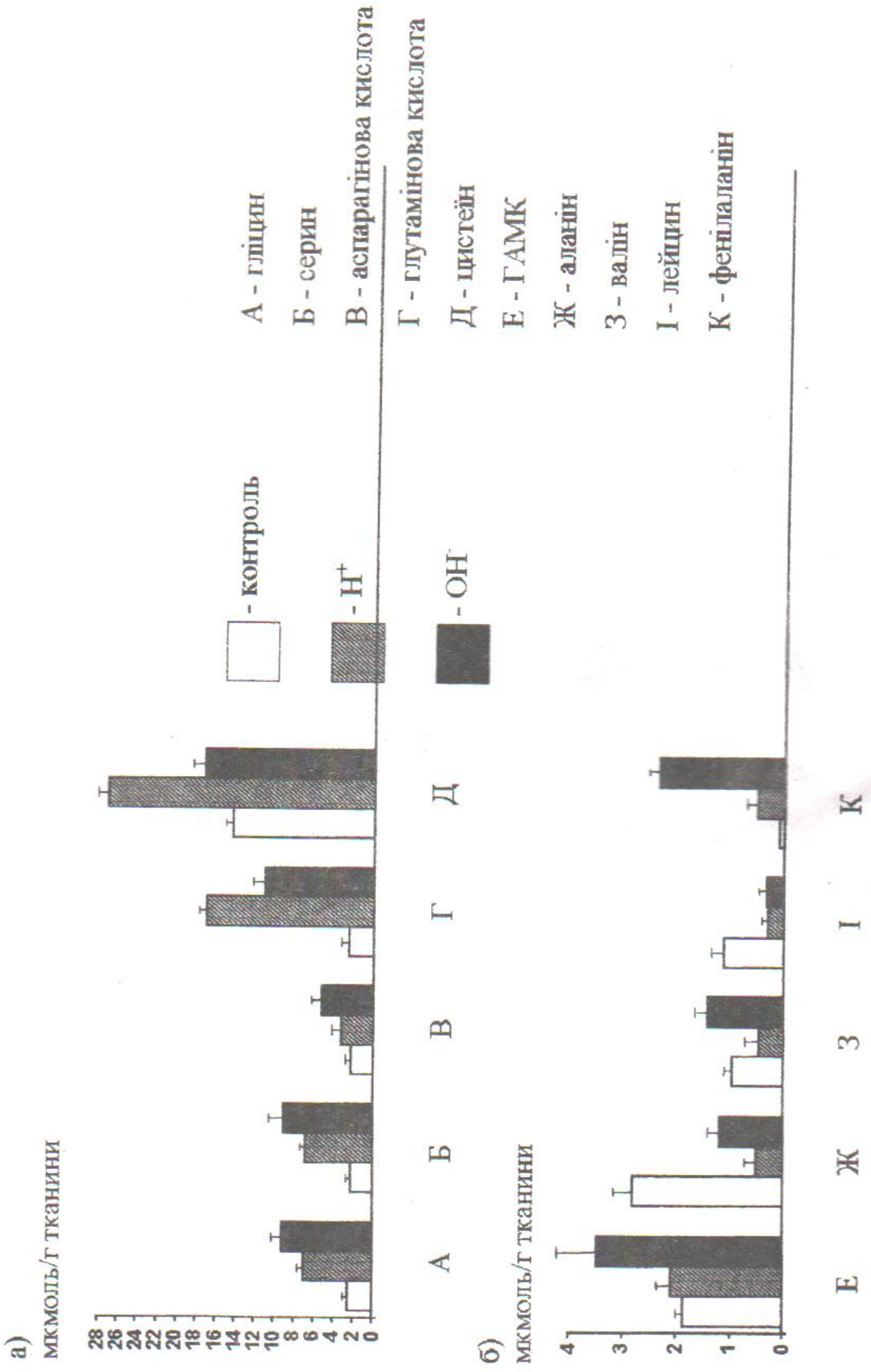


Рис. 2. Вплив гіпоксії на вміст вільних амінокислот у мозку риби при інтоксикації аміаком.

Рис. 3. Вплив змін рН-водного середовища на вміст вільних амінокислот у мозку риби.



лужного гомеостазу у мозку риб. Таке явище при зміні рН (5,0; 7,0; 9,0) раніше відмічено у мозамбікської тіляпії у білих м'язах [19].

Таким чином, аналіз динаміки вільних амінокислот в мозку коропа при різних типах екстремальних впливів показав, що для цього класу речовин в формуванні адаптації до вказаних впливів характерні зміни концентрацій, які зв'язані з виконанням багаточисельних функцій. Головними з функцій можна вважати не тільки відому для вільних амінокислот участь в біосинтезі адаптивних білків, але і енергетичне використання, в окремих випадках більш інтенсивне, ніж окислення вуглецю. Крім того, для деяких амінокислот (цистеїну, глутаміну, аспарагіну) характерна домінуюча над іншими функціями участь у формуванні

специфічних адаптивних реакцій. Динаміка ГАМК і глутамату підтверджує виконання ними нейромедіаторних функцій, особливо при зимовому голодуванні. Ряд амінокислот (глутамінова, аспарагінова, аланін), при стресі є компонентами метаболічних ланцюгів детоксикації аміаку. Для багатьох амінокислот очевидна участь в формуванні захисних буферних систем кислотно-лужного гомеостазу. Можлива участь окремих амінокислот (наприклад цистеїну) в перебудовах і стабілізації структурної та функціональної активності мембран клітин мозку. Все викладене свідчить, що високий метаболічний статус амінокислот у мозку риб може служити одним із засобів регуляції процесів життєдіяльності риб в стресових станах.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреев Б.В., Галустьян Г.Э., Игнатов Ю.Д. и др. Влияние эмоционально-болевого стресса на активность гамма-аминомасляной кислоты // Укр. биохим. журнал, 1983. - Т. 55, №6. - С. 652-656.

2. Грубинко В.В., Коновец И.Н., Явоненко А.Ф. Биохимические закономерности адаптации рыб к аммиаку // Экологическая биохимия рыб. - Ярославль: Б.и., 1990. -С. 59-60.

3. Жиденко А.А., Грубинко В.В., Явоненко А.Ф. Особенности взаимопревращения α -кетоглутарат-глутамат в митохондриях мозга экзотермных животных в условиях зимовки // Укр. биохим. журн. - 1990. -Т.62, №6.-С.79-83.

4. Коцарь Н.И. Установка для длительного поддержания заданного газового режима воды в экспериментальных аквариумах // Гидробиол. журн. - 1975. - Т. 11, №6. - С. 101-107.

5. Лукьяненко В.И. Общая ихтиотоксикология. - Москва: Легк. и пищ. пром-сть, 1983. - 320 с.

6. Маляревская А.Я. Обмен веществ у рыб в условиях антропогенного евтрофирования водоёмов. - Киев: Наукова думка, 1979. - 254 с.

7. Нгуэн Тхи Тхин, Сытинский И.А. Свободная глутаминовая и гамма-аминомасляная кислота в нервной системе краба, лягушки и змеи Северного Вьетнама // Журн. общей биологии. - 1964. - Т. 25, №5. - С. 389-390.

8. Ойвин И.А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований // Патол. физиол. и экспер. терапия. - 1960. - №4. - С. 76-85.

9. Пасхина Т.С. Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге / Современные методы в биохимии. - Москва: Медицина, 1964. - С. 162-181.

10. Савицкий И.В. Биохимия. - Москва: Высшая школа, 1982. - 147 с.

11. Сидоров В.С. Аминокислоты рыб / Биохимия молоди пресноводных рыб. - Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. - 1985. - С. 103-107.

12. Сомкина Н.В., Кричевский А.А. Аминокислоты в мозгу рыб // Журн. эвол. физиол. и биохим. - 1968. - Т. 24, №6. - С. 489-493.

13. Сорвачев К.Ф. Основы биохимии питания рыб. - Москва: Лёгк. и пищ. пром-сть,

1982. - 247 с.

14. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. - Москва: Мир, 1988. - 398с.
15. Шульман Г.Е., Аболмасова Г.И., Столбов А.Я. Использование белка в энергетическом обмене гидробионтов // Успехи совр. биол. - 1993. - Т. 113, №5. - С. 576-586.
16. Явоненко А.Ф., Яковенко Б.В., Грубинко В.В., Жиденко А.А. Зависимость выживаемости молоди карпа в условиях зимовки от содержания свободных аминокислот и белков в мышечной ткани рыб / Рыбное хоз-во. - Киев: Урожай, 1989. - Вып. 43. - С. 24-29.
17. Ali S.N. Paper chromatographic separation of phosphate esters, tricarboxylic cycle acids and amino acid in extracts from malaria parasites / - Liverpool ^ // Liverpool School of Tropical Medicine Pembroke Place, 1983. - V. 7. - P. 35-41.
18. Bhaskar M., Govindappa S. Studies on fish liver carbohydrate metabolism during acclimation to sublethal acidic and alkaline media // Fish Res. - 1985. - V. 3, №4. - P. 343-350.
19. Bhaskar M., Govindappa S. Physiological and metabolic patterns in muscle of fish, *Tilapia mossambica*, on acclimation to altered pH // "AMBIO". - 1985. - V. 14, №6. - P. 349-351.
20. Dabrowska H. Postpuodiol level of free amino acids in fish brain // Comp. Biochem. Physiol. - 1982. - V. 72 B, №4. - P. 559-562.
21. Hyghes G.M. General anatomy of the gills // Fish. Physiol. - 1984. - V. 40, №2. - P. 123-138.
22. Nagai M., Ikeda S. Carbohydrate metabolism in fish. III Effect of dietary composition on metabolism of glucose [U-14C] and glutamate [U-14C] // Nippon Suissan Gakkaishi. - 1972. - V. 38. - P. 137-143.
23. Wan Waarde A. Aerobik and anaerobic ammonium production by fish // Comp. Biochem. And Physiol. - 1983. - V. 74 B, №4. - P. 675-684.

Чернігівський державний педагогічний
університет ім. Т.Г. Шевченка

Стаття надійшла
27.04.1998р

УДК 577.112.3:591.41.1/597.554,3+570.42/048

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ АМИНОКИСЛОТ В МОЗГЕ РЫБ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ВОДНОЙ СРЕДЫ

ЖИДЕНКО А.О., ГРУБИНКО В.В., ЖИДЕНКО В.В., ПУГАЧ Л.В.

Исследована сезонная динамика содержания свободных аминокислот в мозге рыб, а также изменения их уровня при действии стресс-факторов водной среды.

Установлено снижение содержания общего белка в мозге рыб до $30,58 \pm 0,27$ мг/г сухой ткани в конце зимовки (апрель), по сравнению с его содержанием $41,01 \pm 0,34$ мг/г сухой ткани в начале зимовки (сентябрь-октябрь), что отражается на сезонной динамике свободных аминокислот, которая характеризуется двумя пиками: в октябре и феврале.

В условиях аммиачного токсикоза, содер-

жание практически всех свободных аминокислот в мозге карпа увеличивается (на 5-30%), кроме цистеина, уровень которого уменьшается почти в 2 раза, гипоксические условия приводят к обратному действию. Понижение и повышение рН среды вызывает увеличение содержания всех свободных аминокислот. Особенно значительно (в 5-8 раз) возрастает уровень глутамата, глицина, ГАМК.

Полученные данные подтверждают высокий метаболический статус аминокислот в мозге рыб.