

11. Vovk S. The contribution of alanine and leucine to the energetic processes and tissues lipid synthesis in vivo in suckling lambs // *Annales de Zootechnie*.-1995.- 44/Suppl 1/293 p.
12. Feling P., Waron S. Protein turnover and amino acid metabolism in the regulation of gluconeogenesis // *Fed. Proc.*-1974.-39,№4- p. 1052-1056.
13. Harper A.E. Some recent developments in the study of amino acid metabolism // *Proc. Nutr. Soc.*-1983.-42, p. 489-495.
14. Woolfson A.M.J. Amino acids - their role as an energy source // *Proc. Nutr. Soc.*-1983.-42. p. 489-495.
15. Давыдов В. В., Скорик Г В, Крисанова Н.В. Влияние малоната на биосинтез липидов в печени // *Укр. биохим. журн.*-1992.- 64, № 6.- с. 76-79.
16. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований / липидный и энергетический обмен /.- Ленинград.-1982 - 238 с.
17. Янович В.Г., Лагодюк П.З. Обмен липидов у животных в онтогенезе.- М.: Агропромиздат, 1991.- 312 с.
18. Danfaer A, Nutrient metabolism and utilization in the liver // *Livestock Prod. Sci.*-1994.-39. p. 115-127.
19. Christensen H.N. Interorgan amino acid nutrition // *Physiol. Rev.*- 1982.- 62,№4.-p. 1193-1233.

Тернопільський державний педагогічний інститут ім. В. Гнатюка

УДК 577.121.7:591.481.1/597.554.3→57.04

**В.В. ГРУБІНКО, В.В. КРИВОПИША, А.О. ЖИДЕНКО**

## **ОСОБЛИВОСТІ ЕНЕРГЕТИЧНОГО МЕТАБОЛІЗМУ У МОЗКУ КОРОПА ПРИ ІНТОКСИКАЦІЇ ФЕНОЛОМ**

*У статті представлено дані про адаптивні зміни обміну речовин і енергії у мозку коропа при дії фенолу.*

**Ключові слова:** КОРОП, ІНТОКСИКАЦІЯ, ФЕНОЛ, МОЗОК, МЕТАБОЛІЗМ, АДАПТАЦІЯ

Прогресуюче забруднення водного середовища порушує нормальні екологічні умови для життя гідробіонтів. Серед відомих забруднювачів значний токсичний ефект на нервову систему тварин спричиняють різноманітні гомологи фенольного ряду: інсектициди, гербіциди, багато барвників, дія яких на гідробіонтів вивчена ще недостатньо [1]. У дослідженнях В.І. Лук'яненка показано, що провідну роль у формуванні розвитку і зовнішніх проявів симптомів отруєння риб отрутами органічного ряду відіграє головний мозок [1]. Встановлено, що головний мозок відіграє визначальну роль у формуванні реакції риб на фенол. Наприклад, карасі, у яких був повністю вилущений головний мозок, не реагували на токсичний вплив фенолу [1]. За класифікацією токсикантів фенольні сполуки належать до отрут нейро-паралітичної дії. Тому метою даного дослідження стало вивчення впливу фенолу на енергетичний обмін і метаболічний статус мозку коропа лускатого (*Cyprinus carpio L.*) і механізмів адаптації енергетичного гомеостазу мозку коропа до фенолу.

## Матеріали і методи

За об'єкт досліджень використовували коропів одно- та дворічного віку. Досліди проводили у акваріумах об'ємом 200 л з відстояною водопровідною водою, в яку додавали 0,002 мг/л фенолу, що склало 2 рибогосподарських ГДК.

Виділення мітохондрій, визначення ферментних активностей енергогенеруючих реакцій гліколізу і циклу Кребса - лактатдегідрогенази (ЛДГ), сукцинатдегідрогенази (СДГ), малатдегідрогенази (МДГ) та вмісту макроергічних сполук проводили за загальноприйнятим методикам, які описані нами раніше [2], визначення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази проводили за методом [3].

Утворення глюкози із неуглеводних компонентів оцінювали за інтенсивністю незворотніх реакцій глюконеогенезу. Активність глюкозо-1,6-дифосфатази і вміст глюкози визначали за методами, описано раніше [4]. Вміст кетонів у мозку визначали за методом [5] у нашій модифікації [6].

Визначення активності NADPH-залежної глутаматдегідрогенази (NADPH - ГДГ), а також вмісту аміаку в мозку коропа проводили за описаними раніше методиками [7]. Інкубаційна суміш для визначення активності NADH-глутаматдегідрогенази мстила: 0,3 М  $K^+$ -фосфатний буфер, рН 7,8; 0,2 М розчин 2-оксиглутарату, рН 7,8; 0,1 М розчин ацетату амонію; 12 мМ NADH; 39,6 мМ ЕДТА та 0,1 М ADP. Активність ферменту визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм і виражали в наномоль окисненого NADH в розрахунку на 1 мг білку за 1 хв.

Вміст лактату та пірувату визначали ферментним методом [8].

Аналіз амінокислотного складу здійснювали приготуванням гомогенатів наважок тканини мозку у співвідношенні 1:5 (маса:об'єм) в охолодженій до 4<sup>0</sup> С 6% хлорній кислоті, які потім нейтралізували до рН=7,0 0,25М розчином карбонату калію, центрифугували і випаровували досуха. Осад розчиняли в 0,1 мл 0,1н розчину соляної кислоти. Аліквотні частини наносили на хроматографічний папір (Ленінградська середня). Висхідне хроматографування проводили в системі розчинників бутанол:оцтова кислота:вода у співвідношенні: 1-й розчинник - 12:3:5 [9], 2-й розчинник - 40:15:5 [9,10].

Одержані результати опрацьовували статистично [11].

## Результати і обговорення

Дослідження Б.О. Флєрова [12-14] показали, що гідробіонти не мають здатності до довготривалого індивідуального пристосування до дії токсикантів. Одним із способів характеристики енергетичного обміну в мозку риб служить вміст макроергічних сполук і коефіцієнти енергетичного стану клітини: АЕЗ - аденілатний енергетичний заряд; ДМ<sub>ак</sub> - співвідношення діючих мас аденілаткіназної реакції; співвідношення діючих мас системи АТФ. Одержані нами дані, які представлені в таблиці 1, свідчать про зниження рівня АТФ у 2,9 рази, АД (сума аденілатів) - у 1,7 рази, АТФ/АДР - в 3,14 раз у мозку дослідних риб порівняно з контрольними.

Значне зниження вмісту макроергів у мозку риб дослідної групи порівняно до контрольної можна пояснити роз'єднуючою дією фенолу на окиснення і фосфорилування [14].

Підтвердженням цього є також зменшення співвідношення діючих мас АТФ-системи більше, ніж у 3 рази в мозку дослідних риб порівняно з контрольними. У нормі, коли система АТФ-АДР майже повністю фосфорильована, це співвідношення велике. Воно вказує, що швидкість ресинтезу АТФ достатня для забезпечення поточних потреб клітини. При дії фенолу, для його виведення витрачається додаткова енергія АТФ [14]. Поряд із роз'єднанням фосфорилування це є ще однією причиною зниження співвідношення діючих мас АТФ-

системи. Збільшення на 7% концентрації ADP у мозку дослідних риб може сприяти посиленню синтезу ATP з ADP шляхом збільшення швидкості переносу електронів через мембрану [15]. Неорганічний фосфор, на думку С.Е. Северина [16], також служить свосвідним резервом для утворення макроергічних сполук і зниження його рівня на 27% у мозку риб при дії фенолу призводить до зменшення енергоємності клітин мозку.

Таблиця 1. Показники енергетичного стану мозку коропа в нормі і при інтоксикації енолом:  $M \pm m$ ;  $n=9$  (мкмоль/г тканини)

Показники	Контроль	Дія фенолу
ATP	1,20 ± 0,40	0,41 ± 0,11*
ADP	0,81 ± 0,26	0,87 ± 0,33
AMP	0,71 ± 0,19	0,30 ± 0,11*
AD	2,72	1,58
АЕЗ	0,59	0,53
ДМак	1,29	0,16
АТР/АДР	1,48	0,47
$P_i$	3,96 ± 0,36	2,91 ± 0,27
АТР/АДР $P_i$	0,58	0,16

Примітка: \* -  $P < 0,05$

До інгібування ресинтезу ATP призводить також різке зменшення (більше, ніж у 8 разів) співвідношення діючих мас аденілаткіназної реакції. Тільки показники аденілатного енергетичного заряду у мозку дослідних і контрольних риб близькі. Це можна пояснити функціонуванням АМР-дезаміназної системи [17], завдяки якій зниження аденілатного енергетичного заряду компенсується дезамінуванням АМР. Можливість цього процесу підтверджують наші дані про зниження рівня АМР в мозку дослідних риб у 2,4 рази порівняно з його рівнем у мозку контрольних риб. Значення АЕЗ рівного 0,59 - для мозку дослідних риб і 0,53 для контрольної групи показують, що аденілінуклеотидний пул фосфорильований не повністю, а отже існує необхідність "заповнення" аденілінуклеотидної системи [15] високоенергетичними фосфатними групами. Для встановлення можливості протікання цього процесу було визначено активність ферментів основних енергоутворюючих і енергозатратних процесів (гліколізу, циклу Кребса, пентозофосфатного шунту та глюконеогенезу), а також вміст окремих метаболітів цих реакцій. Одержані дані наведені в таблиці 2 і на рис. 2,3.

У мозку риб дослідної групи порівняно до контрольної виявлено збільшення активності цитоплазматичної лактатдегідрогенази у 3 рази, мітохондрійної сукцинатдегідрогенази - у 2 рази, мітохондрійної малатдегідрогенази на 6% (мал.2) свідчить про активацію процесів катаболізму, основним субстратом якого є глюкоза. Вміст останньої у мозку дослідної групи при цьому зменшився на 62% (табл. 2).

Таблиця 2. Вміст деяких метаболітів енергетичного обміну в мозку коропа при дії фенолу:  $M \pm m$ ;  $n=9$  (мкмоль/г тканини)

Умови досліджу	Інтермедіати гліколізу			Кетонові тіла		Сума
	Глюкоза	Лактат	Піруват	Ацетон + ацетоацетат	2-окси-бутират	
Контроль	0,55±0,06	2,53±0,32	0,18±0,02	0,57±0,01	0,08 ± 0,015	0,65
Фенол	0,21±0,07*	1,79±0,28*	0,12±0,01	0,51±0,09	0,31 ± 0,11*	0,82

Активация процесів катаболізму у головному мозку риб при дії фенолу може бути обумовлена дією гормонів гіпоталамо-гіпофізарної системи. За даними ряду авторів [14,18,19], малі концентрації фенолу стимулюють функціональну активність гіпоталамо-гіпофізарної системи, що призводить до посилення процесів продукції нейросекреторної речовини у гіпоталамусі, виведення нейросекрету в нейрогіпофіз і викиду нейрогормонів у кров. Нейрогормони, в свою чергу, посилюють процеси метаболізму. У зв'язку з тим, що запаси глікогену у мозку риб незначні [20], ми провели дослідження активності незворотніх реакцій глюконеогенезу у мозку риб при дії фенолу. Встановлено, що активність глюкозо-6-фосфатази і фруктозо-1,6-фосфатази у мозку риб дослідної групи була відповідно у 4,3 і 1,8 разів більша, ніж у риб контрольної групи. Ці дані свідчать про активацію поряд з катаболітичними також анаболітичних процесів, які спрямовані на забезпечення синтезу глюкози шляхом глюконеогенезу з метою підтримання енергетичного гомеостазу мозку коропа при дії фенолу. Вихідними субстратами для реакцій глюконеогенезу можуть бути глюкогенні амінокислоти, лактат, піруват [21].

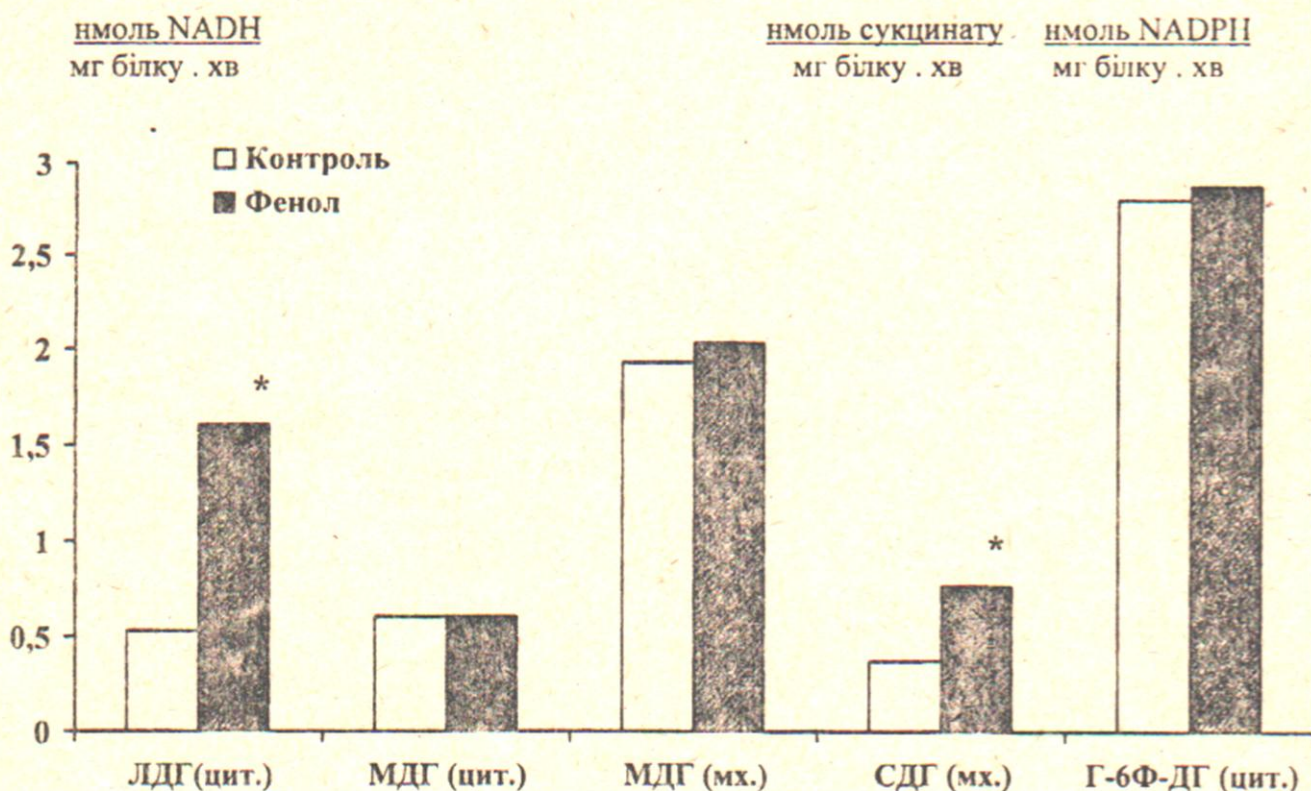


Рис. 1. Активність деяких ферментів енергетичного обміну в мозку риб у нормі та при інтоксикації фенолом; ( $M \pm m$ ;  $n=9$ ).

Підвищення лактатдегідрогеназної активності у мозку коропа при дії фенолу повинно сприяти накопиченню лактату. Як видно із даних таблиці 2 цього не відбувається. Вміст лактату в мозку контрольних риб на 29,2% вищий, ніж у мозку риб дослідної групи. Та ж тенденція спостерігається у вмісті пірувату, що дозволяє зробити попередній висновок, що підвищення активності катаболітичних ферментів у мозку риб при дії фенолу забезпечує вихідними субстратами глюконеогенез і посилює його інтенсивність. Підтвердженням цього можуть служити дані на рис. 2 про вміст вільних амінокислот у мозку коропа в нормі і при дії фенолу. Відомо, що аланін - основний субстрат глюконеогенезу [22]. Його вміст у мозку дослідних риб у 2,8 раз менший, ніж у мозку контрольних риб. Крім того, концентрація деяких інших амінокислот (ГАМК, гліцин, валін, цистеїн, фенілаланін) також вірогідно

нижча, що підтверджує наявні в літературі дані [23] про посилення катаболізму амінокислот в умовах швидкої інтоксикації фенолом. Відомо, що амінокислоти можуть перетворюватися не тільки в глюкозу, але і в кетоніві тіла [15]. Раніше нами була встановлена роль кетоніві тіл в енергозабезпеченні мозку молоді коропа в процесі зимового голодування [6]. Можливість використання кетоніві тіл як додаткового живильного субстрату для мозку коропа в умовах фенольного отруєння може бути доведена активізацією кетогенезу, про який ми судили за зменшенням вмісту кетогенних амінокислот (фенілаланін, цистеїн), а також за збільшенням суми кетоніві тіл на 26,1% у мозку дослідних риб порівняно з контрольними. При цьому рівень 2-оксибутирату збільшується у 3,8 рази при майже однаковій концентрації ацетоацетату і ацетону (табл. 2). Відомо, що синтез кетоніві тіл проходить в клітинах печінки [15], що вони транспортуються кров'ю в основному у вигляді 2-оксибутирату. Використання останнього в метаболічних процесах у клітинах мозку проходить після перетворення його в ацетоацетат.

Виявлений нами високий рівень  $NAD^+$  у головному мозку риб як контрольної, так і дослідних груп свідчить про можливість протікання реакції  $2\text{-оксибутират} + NAD^+ \rightarrow \text{Ацетоацетат} + NADH + H^+$ , яка забезпечує його окиснення. Відомо, що відношення  $NAD^+/NADH$  проявляє також регуляторний на вуглеводний обмін, а саме на гліколіз і глюконеогенез у тканинах тварин [24]. Перемикання гліколізу на глюконеогенез при голодуванні тварин характеризується зниженням цього відношення. При отруєнні коропа фенолом це відношення знижується всього на 5%, що не впливає на активність ЛДГ, Г-6-Ф і Ф-1,6-ДФ в мозку (рис. 1). Проведені дослідження показали, що при загальній активації метаболічних процесів у клітинах мозку коропа при дії фенолу активність  $NADH$ -залежної глутаматдегідрогенази знижується на 27%, а  $NADP$ -залежної форми цього ферменту - на 35%. Зниження активності першого ферменту корелює з достатньо високим рівнем глутамінової кислоти у мозку риб дослідної групи. Вміст аміаку в мозку коропа, який зазнав дії фенолу, на 16% нижчий, ніж у мозку контрольних риб. Як було показано раніше, при аміачному токсикозі в мозку коропа відбувається підвищення активності глутамінсинтетази, що сприяє детоксикації аміаку [25].

Відомо, що зниження кількості заміних вільних амінокислот свідчить про збудження ЦНС [26]. Наявність у воді невеликих концентрацій фенолу (2 ГДК), вплив яких ми вивчали, призводить до зниження рівня таких амінокислот як гліцин, аргінін, валін, цистеїн, аланін, фенілаланін і, особливо, ГАМК більше, ніж у 6 разів (рис. 2). Зниження вмісту ГАМК корелює з збільшенням на 5% рівня глутамінової кислоти в мозку дослідних риб. Можна припустити, що в мозку інгібується глутаматдекарбоксилаза, внаслідок чого стає неможливим утворення ГАМК. Крім того, відношення ГЛУ/ГАМК становить 1,5 в мозку коропа при дії фенолу і 0,2 при його відсутності, що дозволяє пояснити посилення рухової активності риб [1].

## Висновки

При дії фенолу в концентрації, що становить 2 ГДК, в мозку коропа зменшується вміст макроергічних речовин і коефіцієнтів енергетичного стану клітини, за винятком АЕЗ. Зменшується вміст гліцину, аргініну, валіну, цистеїну, аланіну, фенілаланіну, ГАМК, при відсутності змін або незначному збільшенні вмісту серину, глутамінової і аспарагінової кислот, концентрація глюкози, лактату, пірувату, відношення  $NAD^+/NADH$  та  $NADH$ - і  $NADPH$ -залежної глутаматдегідрогеназної активності, підвищується активність катаболітичних (ЛДГ, МДГ, СДГ) і анаболітичних (Г-6-Ф, Ф-1,6-ДФ) ферментів і вмісту кетоніві тіл. Формування адаптивних змін обміну речовин і енергії у головному мозку коропа включає синтез кетоніві тіл як додаткового джерела енергозабезпечення мозку.

## THE PECULIARITY OF ENERGETIC METABOLISM IN CARP BY THE PHENOL INTOXICATION

### Summary

The influence of phenol on energy metabolism and metabolic status of brain of carp (*Cyprinus carpio* L.) by the intoxication of phenol (2 MPC) during 14 days has been conducted. The reduction of the content of macroergic compounds and of coefficients of energy status of cells, switching AEC; decrease of the content in the brain of glycine, arginine, valine, cisteine, alanine, phenilalanine and GABA at stable or insignificant increase of the level of serine, glutamic and aspartic acids; reduction of the concentration of glucose, lactate, pyruvate, parity of  $NAD^+/NADH$  bath  $NADH$ - and  $NADPH$ - dependent glutamatedehydrogenase; increase of the activity of catabolic (LDZ, MDZ, SDZ) and anabolic (G-6-P, F-1,6 DP) enzymes and content of ketone bodies has been revealed. The conclusions about formation of adaptive reorganizations of metabolism, among which the most important is synthesis of ketone bodies as the additional source in the energy supply of the brain have been made

Ternopil State Pedagogical V. Gnatyuk University

1. Лукьяненко В.И. Общая ихтиотоксикология.- М.: Легкая и пищ. пром-сть, 1983.- 320 с.
2. Жиденко А.А., Яковенко Б.В., Явоненко А.Ф. Состояние энергогенерирующей системы в тканях зимующей молоди карпа.- К., 1990.-27 с. Рукопись деп. в ВИНТИ, № 61-В90.
3. Biochemica information.- W.- Germany: Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, 1975.- Bd 1.- P. 99-100.
4. Явоненко О.Ф., Грубинко В.В., Жиденко А.О. Динаміка вуглеводів у тканинах молоді коропа в процесі зимівлі // Рибне госп-во.- 1993.- Вип. 47.- С.18-21.
5. Баев В.И., Булах Б.И. Способ определения кетоновых тел в тканях// Материалы IV конф. выступлений по изобретению и рационализации в медицине.-Л.: Медицина, 1973.- С. 89-90.
6. Жиденко А.А., Грубинко В.В., Явоненко А.Ф. Роль кетоновых тел в энергообеспечении пойкилотермных организмов в условиях зимнего голодания // Укр. биохим. журн.- 1990.- 62, № 5.- С. 72-76.
7. Жиденко А.А., Грубинко В.В., Явоненко А.Ф. Особенности взаимопревращения  $\alpha$ -кетоглутарат – глутамат в митохондриях мозга экзотермных животных в условиях зимовки // Укр. биохим. журн.- 1990.- 62, № 6.- С. 79-83.
8. Методы биохимических исследований /Под. Ред М.И. Прохоровой.- Л.: ЛГУ.- 1982.- 270 с.
9. 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.- 7.- P. 35-41.
10. Пасхина Т.С. Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге // Современные методы в биохимии.- М.: Медицина, 1964.- С. 162-181.
11. Ойвин И.А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований//Патол. физиол. и эксперим. терапия.- 1960.- № 4.- С. 76-85.
12. Флеров Б.А.Изучение адаптации гуппи к фенолу//Гидробиол. журн.- 1970.- 6, № 3.- С. 104-106.
13. Флеров Б.А. К вопросу о приспособлении гидробионтов к токсическому фактору//Гидробиол. журн.- 1971.-7, № 6.- С. 61-66.
14. Флеров Б.А. Физиологические механизмы действия токсических веществ и приспособления к ним водных животных //Гидробиол. журн.- 1977.- 13, № 4.- С. 80-86.

15. Ленинджер А. Основы биохимии. Т. 2.- М.: Мир, 1985.- 368 с.
16. Северин С.Е. Энергетическое обеспечение физиологических функций //Вестник АН СССР.- 1965.- № 7.- С. 42-58.
17. Lowenstein J.M. Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide Cycle //Physiol Rev.- 1972.- 52, '2.- Д. 382-414.
18. Матей В.Е. Гипоталамическая нейросекреция у гупши в условиях длительной фенольной интоксикации //Влияние фенола на гидробионтов.- 1973.- С. 39-49.
19. Матей В.Е. Действие фенола на ЦНС и эндокринную систему костистых рыб //Тр. ИБВВ АН СССР.- 1976.- С. 97-117.
20. Taft H.L.A. Biochemistry of fishes //Ann. Rev. Biochem.- 1958.- 27.- P.223-244.
21. Cornish I., Moon T.W. Glucose and lactate kinetics in American eel *Anguilla rostrata* (LeSueur)//Am. J. Physiol.- 1985.- 249.- P. 67-72.
22. French C.J., Mommsen T.P., Hochachka P.W. Amino acid utilization in isolated hepatocytes from rainbow trout //Eur. J. Biochem.- 1981.- 113.- P. 311-317.
23. Сомкина Н.В., Кричевская А.А. Аминокислоты в мозге рыб // Журн. эволюц. физиол. и биохим.- 1968.- 4, № 6.- С. 489-493.
24. Великий Н.Н., Пархомец П.К. Ферментативные аспекты регуляции внутриклеточного распределения кофакторов и метаболитов в печени крыс// Биохимия животных и человека.- 1978, № 2.- С.
25. Грубінко В.В. Адаптивні реакції риб до дії аміаку водного середовища.- Автореф. ... дис. д-ра біол. наук: 03.00.18, 03.00.04/ НАН України. Інститут гідробіології.- К., 1995.- 44 с.
26. Пиканоров С.И. Передний мозг и поведение рыб.- М.: Наука, 1982.-208 с.

Тернопільський державний педагогічний університет ім. В.Гнатюка  
 Чернігівський державний педагогічний університет ім. Т.Г. Шевченка

УДК 536.4.084:612.415.3

**Р.П.ПАРАНЯК, В.Г.ЯНОВИЧ**

## **ВПЛИВ ДОБАВОК РІПАКОВОЇ ОЛІЇ ДО РАЦІОНУ ВІДГОДІВЕЛЬНИХ СВИНЕЙ НА СИНТЕТИЧНІ І ЕНЕРГЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ У СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗАХ В УМОВАХ IN VITRO**

*У статті представлено дані про вплив добавок ріпакової олії до раціону відгодівельних свиней на їх ріст, синтетичні та енергетичні процеси у скелетних м'язах. Встановлено підвищення інтенсивності синтезу білків, зниження інтенсивності катаболізму амінокислот і збільшення використання глюкози та жирних кислот в енергетичних процесах у скелетних м'язах свиней при згодовуванні ріпакової олії.*

**Ключові слова:** СВИНІ, РІПАКОВА ОЛІЯ, БІЛКИ, ЛІПІДИ, ГЛЮКОЗА, ЖИРНІ КИСЛОТИ, АМІНОКИСЛОТИ

За даними ряду авторів [1-3], використання жирів у годівлі відгодівельних свиней у вигляді добавок до раціону позитивно впливає на їх прирости і оплату корму. Так, при додаванні до раціону свиней при дорощуванні і відгодівлі тваринних і рослинних жирів в