

УДК 577.15:591.133.13:597.551.2+591.3

О. Б. Мехед, Б. В. Яковенко, А. А. Жиденко

АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В ТКАНЯХ СЕГОЛЕТОК И ДВУХЛЕТОК КАРПА В ОСЕННИЙ ПЕРИОД

Установлено, что метаболические процессы у сложно организованных многоклеточных животных зависят от стадии развития их организма и условий окружающей среды [14, 15]. В большинстве случаев для изучения активности ферментов используют либо сеголеток, либо двухлеток карпа. Например, изучение влияния температуры на процессы биосинтеза и аккумуляции энергетических субстратов проводили на двухлетках карпа [5], динамику углеводов в процессе зимовки — на сеголетках [2]. Для сравнительной характеристики НАДФН-зависимых дегидрогеназ были использованы половозрелые и неполовозрелые особи карпа [6].

Целью нашей работы было сравнительное исследование активности ключевых ферментов гликолиза, пентозофосфатного пути (ПФП) окисления глюкозы, цикла трикарбоновых кислот, процесса глюконеогенеза у сеголеток и двухлеток карпа в период подготовки рыб к условиям зимнего голодания. Полученные данные помогут понять механизм адаптации организма карпа к условиям окружающей среды на разных стадиях развития рыб.

Материал и методика исследований. Объектом исследования служили сеголетки и двухлетки карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio* L.). Рыб содержали в аквариумах емкостью 200 л при стандартном газовом и гидрохимическом режиме (содержание кислорода в воде 6,0—7,0 мг/л, углекислого газа — 2,2—2,8 мг/л, рН 7,6—7,8). Опыты проводили в октябре — ноябре 2002 г., температура воды в аквариумах была близка к таковой в естественных условиях и составляла 10—11°C.

Для анализа использовали белые мышцы, печень и мозг карпа. Из гомогената тканей путем центрифугирования выделяли ядра и обломки клеток (600 г, 15 мин), митохондрии (12000 г, 25 мин). Надосадочную фракцию называли цитоплазматической. В цитоплазматической фракции этих тканей определяли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Фазы) и фруктозо-1,6-дифосфатазы (Ф-1,6-ДФазы). Митохондриальную фракцию использовали для определения активности изоцитратдегидрогеназы (ИЦДГ). Определение ак-

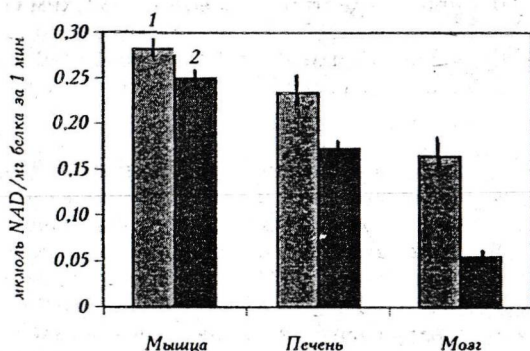
тивности ферментов проводили по общепринятым методикам [18]. Ферментативную активность Г-6-Фазы и Ф-1,6-Фазы оценивали по количеству высвободившегося в реакции неорганического фосфата [4, 13], который определяли по Фиске — Суббароу [21]. Реакционная смесь для определения Г-6-Фазы была следующей: 0,3 мл 0,087 М цитратного буфера с $\text{pH} = 6,5$; 0,1 мл глюкозо-6-фосфата, через 3 мин преинкубации добавляли 0,2 мл исследуемого ферментного препарата цитоплазмы и инкубировали 30 мин.

Аналогично определяли активность Ф-1,6-Дфазы, но инкубационная смесь содержала 0,5 мл 0,2 М трис-НСI буфера с $\text{pH} 7,5$, 0,3 мл 0,1 М MgCl_2 , 0,15 мл фруктозо-1,6-дифосфата. Ферментативную активность выражали в микромолях неорганического фосфора (P_i) на 1 миллиграмм белка за 1 минуту. Количество белка в пробах определяли по методу Лоури с соавторами [24]. Полученные данные обрабатывали статистически по И. А. Ойвину [10].

Результаты исследований

В условиях опыта активность ЛДГ обнаруживается во всех исследуемых тканях карпа (рис. 1). Наибольшая активность данного фермента имеет место в цитоплазматической фракции белых мышц как сеголеток, так и двухлеток, несколько меньшая — в печени и наименьшая — в мозге. Таким образом, исследуемые ткани по уровню активности ЛДГ в порядке убывания располагаются следующим образом: «мышцы — печень — мозг», что согласуется с данными об интенсивности протекания гликолиза, полученными для леща [12] и морских рыб [16].

Обращает на себя внимание тот факт, что активность ЛДГ в мышцах, печени и мозге несколько выше у сеголеток, чем у двухлеток, хотя полученные различия не достоверны. Так, в белых мышцах сеголеток активность ЛДГ составляет $0,282 \pm 0,022$ мкмоль $\text{NAD}/\text{мг}$ белка за 1 мин, в то время как у двухлеток — $0,250 \pm 0,021$ ($P > 0,05$). Аналогичная картина наблюдается в цитоплазматической фракции печени, однако различия в активности ЛДГ у сеголеток и двухлеток

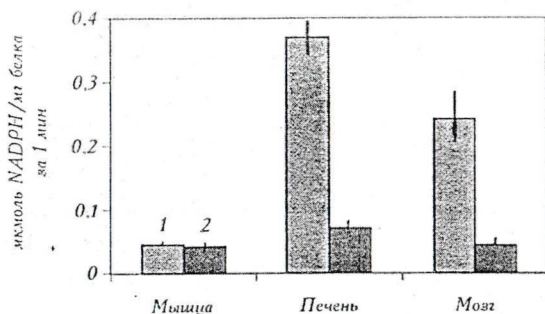


1. Активность лактатдегидрогеназы в тканях сеголеток (1) и двухлеток (2) карпа.

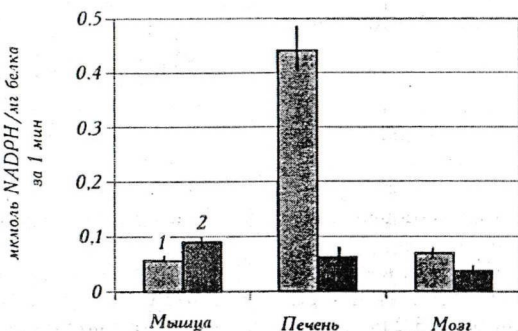
выражены в несколько большей степени (соответственно $0,234 \pm 0,034$ и $0,173 \pm 0,023$ мкмоль $\text{NAD}/\text{мг}$ белка за 1 мин, $P < 0,2$). Что касается мозговой ткани, то у сеголеток активность ЛДГ достоверно выше, чем у двухлеток — $0,165 \pm 0,030$ мкмоль $\text{NAD}/\text{мг}$ белка за 1 мин против $0,055 \pm 0,010$, что в 3 раза выше ($P < 0,01$). Таким образом, у сеголеток карпа анаэробный метаболизм в

исследованных тканей выражен в большей мере, чем у двухлеток.

Что касается ИЦДГ — фермента аэробного метаболизма (ЦТК), то здесь картина несколько иная (рис. 2). Наибольшая активность этого фермента обнаруживается в митохондриальной фракции печени сеголеток карпа в 5,2 раза выше, чем у двухлеток ($0,370 \pm 0,081$ мкмоль NADPH/мг белка за 1 мин против $0,071 \pm 0,012$; $P < 0,01$). Значительно выше, почти в 5,5 раза, активность ИЦДГ и в мозговой ткани сеголеток — она составляет $0,242 \pm 0,082$ мкмоль NADPH/мг белка за 1 мин, тогда как у двухлеток — только $0,044 \pm 0,004$ ($P < 0,05$). Активность ИЦДГ в мышцах составляет всего $0,045 \pm 0,007$ мкмоль NADPH/мг белка за 1 мин у сеголеток и $0,042 \pm 0,017$ — у двухлеток.



2. Активность изоцитратдегидрогеназы в тканях сеголеток (1) и двухлеток (2) карпа.



3. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в тканях сеголеток (1) и двухлеток (2) карпа.

Данные по определению активности Г-6-ФДГ свидетельствуют о чрезвычайно важной роли печени сеголеток в превращении глюкозы пентозо-фосфатным путем (рис. 3). Активность данного фермента у более молодых особей в 6,8 раза выше, чем в печени двухлеток ($0,422 \pm 0,082$ мкмоль NADPH/мг белка за 1 мин против $0,062 \pm 0,003$; $P < 0,01$). Очень низкой активностью по сравнению с таковой в печени обладает Г-6-ФДГ мозга и белых мышц как у сеголеток, так и у двухлеток. Так, в мозговой ткани она составляет у сеголеток всего $0,070 \pm 0,011$, а у двухлеток — $0,038 \pm 0,006$ мкмоль NADPH/мг белка за 1 мин. Несмотря на общий низкий уровень активности данного фермента, в мозге сеголеток он достоверно выше, чем в мозге двухлеток ($P < 0,05$). Что касается белых мышц карпа, то у двухлеток превращение глюкозы с участием Г-6-ФДГ, наоборот, происходит более интенсивно, чем у сеголе-

1. Активность Г-6-Фазы в тканях сеголеток и двухлеток карпа, мкмоль P_i на 1 мг белка за 1 мин ($M \pm m, n = 6$)

Ткани	Сеголетки	Двухлетки
Мышца	0,112±0,028	0
Печень	1,210±0,051	0,231±0,003*
Мозг	0,201±0,032	0,046±0,003*

* — различия достоверны.

2. Активность Ф-1,6-ДФазы в тканях сеголеток и двухлеток карпа, мкмоль P_i на 1 мг белка за 1 мин ($M \pm m, n = 6$)

Ткани	Сеголетки	Двухлетки
Мышца	0,841±0,121	0,193±0,001*
Печень	0,279±0,083	0,180±0,032
Мозг	0,093±0,012	0,031±0,004*

* — различия достоверны.

ток, и составляет $0,091 \pm 0,001$ против $0,057 \pm 0,005$ мкмоль NADP/мг белка за 1 мин ($P < 0,001$).

Результаты изучения ферментативной активности необратимых реакций глюконеогенеза, в частности Г-6-Фазы, приведены в таблице 1.

Активность данного фермента у рыб разного возраста максимальна в цитоплазматической фракции печени. При этом Г-6-Фаза печени сеголеток отличается в 5,2 раза большей активностью по сравнению с двухлетками. Значительно больше выражено действие фермента и в мозговой ткани молодых рыб. Необходимо отметить, что в цитоплазматической фракции белых мышц двухлетнего карпа не обнаружена активность Г-6-Фазы, в то время как у сеголеток в данной ткани она составляет $0,112 \pm 0,028$ мкмоль P_i на 1 мг белка за 1 мин.

Данные по ферментативной активности Ф-1,6-ДФазы представлены в таблице 2.

Наибольшая активность данного фермента как у сеголеток, так и у двухлеток наблюдается в цитоплазматической фракции белых мышц (соответственно $0,841 \pm 0,121$ и $0,193 \pm 0,001$ мкмоль P_i / мг белка за 1 мин). При этом активность Ф-1,6-ДФазы у рыб разного возраста различается в 4,35 раза ($P < 0,001$). Несколько меньше активность цитоплазматической Ф-1,6-ДФазы в печени рыб, минимальна — в мозговой ткани. Но во всех изученных тканях более интенсивно действие данного фермента проявляется у более молодых рыб. Что касается мозговой ткани, то у сеголеток активность Ф-1,6-ДФазы в 3 раза выше, чем у двухлеток — $0,093 \pm 0,012$ против $0,031 \pm 0,004$ мкмоль P_i /мг белка за 1 мин ($P < 0,001$). Такая же тенденция наблюдается и в печени рыб, хотя различия не достоверны ($P > 0,05$).

Обсуждение результатов исследований

Полученные данные показали, что в печени сеголеток карпа по сравнению с двухлетками при снижении температуры воды в осенний период более интенсивно протекают и реакции гликолиза, и тканевое дыхание. Последнее обстоятельство даёт более молодым особям возможность быстро переключаться с гликолитического пути на аэробный для получения химической формы энергии (АТФ). Более интенсивно процессы окисления осуществляются у сеголеток в мозговой ткани, где активность ЛДГ и ИЦДГ значительно выше, чем у двухлеток. Такой вывод согласуется с литературными данными о том, что в раннем онтогенезе рыб наблюдается изменение как уровня, так и характера метаболизма [9]. Что же касается мышечной ткани, то особых различий в ферментативной активности здесь не наблюдается.

Наряду с этим, в начале осеннего периода, когда температура воды в водоёмах снижается до 10—12°C, печень сеголеток отличается более высокой глюконеогенезной активностью по сравнению с печенью двухлеток. Особенно это выражено в активности Г-6-Фазы. Выше в этом органе у сеголеток и активность Ф-1,6-Дфазы. Это свидетельствует о том, что процесс глюконеогенеза в печени сеголеток в таких условиях протекает на более высоком уровне, что даёт возможность молодому организму синтезировать глюкозу из других метаболитов более интенсивно.

Однако повышение активности Г-6-ФДГ в печени сеголеток в 6,8 раз по сравнению с аналогичным показателем у двухлеток говорит также о том, что организм более молодых рыб тратит больше энергии при адаптации к условиям низкой температуры. Вышеизложенные результаты свидетельствуют о большем значении пентозо-фосфатного пути превращения углеводов в печени и мозге сеголеток карпа по сравнению с двухлетками, что согласуется с литературными данными о снижении интенсивности пентозо-фосфатного шунта (ПФС) по мере роста и развития рыб [7]. Пентозы, полученные в результате функционирования ПФШ, утилизируются при синтезе рибонуклеиновых кислот [11], ПФШ необходим также для синтеза восстановленных кофакторов.

При сравнении активности ЛДГ в различных тканях рыб констатировали более интенсивное протекание процесса гликолиза в мышцах, что является характерным для белой мускулатуры, поскольку энергия гликолиза используется организмом рыб для быстрых и внезапных движений [3].

Также характерным для мышечной ткани карпа в этих условиях является более интенсивный процесс превращения глюкозы у двухлеток пентозо-фосфатным путем. Как известно, одной из функций ПФП является образование восстановленных форм НАДФН + Н⁺ с участием Г-6-ФДГ. Восстановленные НАДФН + Н⁺ далее используются в биосинтезе жиров. Последние необходимы организму не только как источник энергии, но также при биосинтезе глюкозы в период перехода карповых и других видов рыб к зимнему голоданию [17]. К ПФП превращения глюкозы у двухлеток подключается и белая мускулатура. Несмотря на меньшую активность Г-6-ФДГ в белых мышцах карпа по сравнению с печенью, благодаря значительно боль-

шей массе белая мускулатура может вносить значительный вклад в образование глюкозы в организме рыб.

Увеличение активности Ф-1,6-ДФазы в мышцах (см. табл. 2) некоторые авторы [8, 20] объясняют функционированием субстратного цикла между Ф-6-Ф и Ф-1,6-ДФ. Кроме того, можно предположить, что это связано с интенсивным использованием Ф-6-Ф в ПФП.

Мозговая ткань сеголеток карпа в исследуемый период характеризуется более интенсивными реакциями аэробного обмена. На этом фоне обращает на себя внимание значительная активность ИЦДГ и Г-6-ФДГ по сравнению с двухлетками. Большая активность Г-6-Фазы и Ф-1,6-ДФазы в мозговой ткани у сеголеток свидетельствуют о более быстром обеспечении мозга глюкозой у молодых особей.

Таким образом, результаты эксперимента свидетельствуют о большей интенсивности протекания всех исследованных реакций у более молодых рыб, на основании чего можно сделать вывод о более экономном расходовании энергетических субстратов в организме карпа в осенний период с увеличением возраста рыб.

У сеголеток по сравнению с двухлетками в осенний период более интенсивно протекают реакции аэробного и анаэробного обмена. Но у молодых рыб более адаптированным в углеводном обмене является более древний путь Эмбдена — Мейергофа [1], о чем свидетельствуют полученные нами данные об активности ЛДГ. С возрастом, по мере совершенствования метаболических путей, траты энергоресурсов становятся более экономными, поскольку главной чертой адаптированной системы является экономичность функционирования.

Кроме того, низкая температура и голодание в осенний период также предполагают включение в энергообеспечение пойкилотермных организмов пути Эмбдена — Мейергофа [1]. Конечным продуктом гликолитического окисления эндогенных соединений является молочная кислота — один из основных субстратов глюконеогенеза [23], особенно для голодающего организма [19].

Заключение

Представлены результаты изучения активности отдельных ферментов углеводного обмена (лактатдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатаза, фруктозо-1,6-дифосфатаза) в разных тканях карпа чешуйчатого в осенний период у сеголеток и двухлеток. Показано, что активность ферментов существенно различается в зависимости от возраста рыб и ткани. У сеголеток более интенсивно протекают реакции аэробного и анаэробного обмена, что даёт возможность более молодым рыбам быстрее переключаться с гликолитического пути на аэробный для получения химической энергии. С возрастом затраты энергоресурсов становятся более экономными, поскольку главной чертой адаптированной системы является экономичность функционирования.

**

Викладено результати вивчення активності окремих ферментів вуглеводного обміну (лактатдегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, глюкозо-6-фосфатази, фруктозо-1,6-дифосфатази) в різних тканинах коропа лускатого різного віку в осінній період. Показано, що активність ферментів в різних тканинах суттєво відрізняється залежно від віку риб. Уцьогорічок інтенсивніше перебігають реакції аеробного та анаеробного обміну, що дає змогу молодим рибам швидше переключатись з гліколітичного на аеробний шлях для одержання хімічної форми енергії. З віком витрати енергоресурсів стають більш економними, оскільки головною рисою адаптованої системи є економічність функціонування.

**

The activity of lactate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-biphosphatase had been examined under conditions of autumn in tissues, liver and brain of carp (which have been born this year and two years old). The level of activity basic enzymes glycolysis, Krebs cycle, pentose phosphate pathway and gluconeogenes are influence of fishes age.

**

1. Арсан О.М. особенности функционирования основных механизмов энергообеспечения процессов акклимации рыб к абиотическим факторам водной среды: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — М., 1987. — 37 с.
2. Жигенко А.А. Особенности метаболизма энергетических компонентов у зимующей молодежи карпа и роль адаптивных механизмов в её выживаемости: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1990. — 18 с.
3. Кугрявцев Г.В., Жебеняева Т.Н., Гойло Т.А. Ферменты пентозо-фосфатного пути и некоторые стороны нуклеинового обмена в процессе онтогенеза речной миноги // Вопросы раннего онтогенеза рыб: Тез. докл. II Всесоюз. конф. — Киев: Наук. думка, 1978. — С. 109.
4. Львова С.П. Фосфорилазная и глюкозо-6-фосфатазная активность в тканях крыс в онтогенезе // Укр. биохим. журн. — 1985. — 57, № 1. — С. 36—41.
5. Малиновская М.В. Пути метаболизма углеводов у рыб и их температурная адаптация (обзор) // Гидробиол. журн. — 1988. — 24, № 6. — С.29—39.
6. Малиновская М.В. Возрастные изменения активности NADP-зависимых дегидрогеназ в печени карпа // Там же. — 1996. — 32, № 3. — С. 96—97.
7. Моисеев П.А., Азизова Н.А., Куранова И.И. Ихтиология. — М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1981. — 384 с.
8. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма. — М.: Мир, 1977. — 407 с.
9. Озернюк Н.Д. Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб. М.: Наука, 1985. — 197 с.
10. Ойвин И.А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований // Патол.физиол.и экспер.терапия. — 1960. — № 4 — С. 76—85.

11. Романенко В.Д. Печень и регуляция межжучного обмена (млекопитающие и рыбы). — Киев: Наук. думка, 1978. — 184 с.
12. Рябцева И.П., Степанова И.Э. Активность дегидрогеназ леца Волжских водохранилищ // Экол. проблемы бассейнов крупн. рек-2: Тез. докл. междунар. конф., Тольятти, 14—18 сент., 1998. — Тольятти, 1998. — С. 240—241.
13. Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича — М.: Медицина, 1964. — 345 с.
14. Хочачка П., Сомеро Д. Биохимическая адаптация. — М.: Мир, 1988. — 568 с.
15. Шульман Г.Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. — М.: Пищ. пром-сть, 1972. — 368 с.
16. Эмеретли И.В., Русинова О.С. Активность ферментов основных путей окисления углеводов в тканях рыб // Гидробиол. журн. — 2001. — 37, № 1. — С. 79—87.
17. Яковенко Б.В. Метаболізм гліцину в організмі коропа лускатого: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — Львів, 1993. — 37 с.
18. Biochemika information. — W. — Germany: Boehringer Mannheim GmbH, Biochemika, 1975. — 1. — S. 99—100; 2. — S. 101—102, 167.
19. Cornish I., Moon T.W. Glucose and lactate kinesis in American eel, *Anguilla rostrata* (Lesueur) // Am. J. Physiol. — 1985. — 249. — P. R67—R72.
20. Crabtree B., Newsholme E.A. The activities of phosphorilase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and the glycerol-3-phosphate dehydrogenases in muscles from vertebrates and invertebrates // Biochem. J. — 1972. — 126, N 1. — P. 49—58.
21. Fiske C.H., Subbarow J. The colorimetric determination of phosphorus // Ibid. — 1925. — 66, N 1. — P. 375—400.
22. Lowry O.H., Rosebrough N.I. Farr A.I., Rendall R.I. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951 — 193, N 1. — P. 265—275.
23. Soares K.K., Mommsen T.P. Gluconeogenesis in teleost fishes // Can. J. Zool. — 1986. — 65, N 8. — P. 1869—1882.