УДК (577.1:597.551.2):574.64

*В. Д. Романенко, А. С. Потрохов, О. Г. Зиньковский*

# ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ СОДЕРЖАНИЯ АММИАКА У КАРПА

Исследовано изменение активности глутаматдегидрогеназы, аланин- и аспартатаминотрансферазы в органах и тканях карпа под многолетним влиянием повышенной концентрации аллохтонного азота. Установлено, что у рыб существует два различных способа (зимний и летний) физиологической адаптации к действию токсических факторов среды в зависимости от температуры. Отмечено, что в вегетационный период наблюдается усиление активности общего метаболизма рыб в ответ на воздействие азотистых соединений, а при низких температурах снижается интенсивность обмена между внешней и внутренней средой организма.

***Ключевые слова:*** *карп, белки, активность ферментов, аллохтонный азот, адаптация.*

Одним из наиболее распространенных токсикантов водной среды являются азотистые соединения, в первую очередь аммиак, ионы аммония и нитриты. Неионизированная форма аммиака высокотоксична для большинства водных животных, при этом он выступает и как химический стрессор [11]. У рыб отмечаются существенные видовые различия в чувствительности к его действию [16]. Баланс между поступлением из окружающей среды, продуцированием в организме рыб [14] и выделением аммиака может быть нарушен действием многочисленных эндогенных и экзогенных факторов [20].

Подавляющая часть конечных продуктов обмена азота (75—90%) выделяется рыбами в виде аммиака через жабры [12, 13], а меньшее количество — в форме мочевины, креатина, ансерина, карнозина, триметиламина и некоторых аминокислот. Ускорение интенсивности энергетических процессов и утилизации энергоемких веществ, активизация дыхания, процессов окисления изменяют равновесие в сторону преобладания ионизированной формы аммиака, усиливают их экскрецию [1, 2, 8, 17].

Активная экскреция и связывание аммиака в нетоксичные глутамин и аспарагин являются основными механизмами противодействия избыточному поступлению аммиака в ткани и органы рыб [7, 8]. Высокий уровень ак-

© Романенко В. Д., Потрохов А. С., Зиньковский О. Г., 2009

тивности NAD(H)-зависимой глутаматдегидрогеназы указывает на образование аммиака путем дезаминирования [10]. Дезаминирование аминокислот осуществляется глутаматдегидрогеназным путем преимущественно в печени. Связанный в нетоксичный глутамин [7] или в свободном виде аммиак приносится кровью к жабрам [1, 2, 17]. Такой адаптационный механизм отмечается у всех амонилитических животных и характерен для костистых рыб, в частности карпа.

Концептуальным подходом к изучению особенностей адаптации рыб к изменению содержания азотистых соединений в водной среде является представление о том, что в различные сезоны года изменяется интенсивность обмена веществ, которая существенно влияет на механизмы поддержания гомеостаза в их организме. При содержании рыб в условиях повышенного уровня экзогенного аммония отмечаются существенные сезонные отличия в его тканевом содержании у рыб. Так, в весенне-летний период, когда значительно повышается интенсивность метаболических процессов, уровень аммиака в тканях рыб значительно ниже, чем в осенне-зимний период, что объясняется более высоким уровнем экскреции. Такая закономерность дает возможность говорить о том, что в зависимости от сезонных особенностей метаболизма, с одной стороны, изменяется потенциал возможностей рыб противодействовать поступлению аммиака из вне, а с другой, изменяется уровень его экскреции из организма.

Целью нашей работы является изучение сезонных особенностей протекания ферментативных процессов, связанных с трансаминированием, дезаминированием и экскрецией азотистых соединений.

**Материал и методика исследований.** Эксперименты были проведены на Белоцерковской экспериментальной гидробиологической станции Института гидробиологии НАН Украины. В непрерывных четырехлетних хронических экспериментах использовали годовиков карпа, завезенных из прудового хозяйства, характеризующегося нормативными гидрохимическими показателями. После 30-суточной адаптации в пруду, водоснабжение которого осуществлялось чистой речной водой, рыбы были расселены в три пруда площадью 0,04 га со средней глубиной 1,2 м. Контрольный пруд № 1 обеспечивался водой из р. Рось. Пруд № 2 — из водоснабжающего пруда, куда поступают с родниковыми водами значительные концентрации минерального азота. В пруд № 3 поступала вода из водоснабжающего пруда, а также из родников, имеющихся в его ложе. В период исследований для кормления рыб искусственные корма не применялись.

Содержание минерального азота в воде контрольного пруда составляло: аммонийный азот — 0,088—0,243 мг N/дм$^3$, нитритный — 0,003—0,01, нитратный — 0,1—0,28 мг N/дм$^3$ [4]. В опытных прудах № 2 и № 3 концентрация аммония была соответственно: весной — 9,1—21,5 и 13,6—26,5 N/дм$^3$, летом — 13,7—35,7 и 15,0—65,4, осенью — 29,2—42,5 и 27,9—62,2 мг N/дм$^3$; нитритов (в двух прудах): весной 0,99—1,46 мг N/дм$^3$, летом — 1,75—3,27, осенью — 0,32—1,83 мг N/дм$^3$. Концентрация азота нитратов в воде из этих двух прудов весной — 6,27—21,61 мг N/дм$^3$, летом — 8,32—19,04 N/дм$^3$. То есть пруд № 2 был менее загрязнен поступающим аллохтонным азотом.

Количество суммарных белков определяли по Лоури [6], активность аланин- и аспартатаминотранферазы (АлАТ, АсАТ) — по В. В. Меншикову [5]. Субстратно-буферная смесь (pH 7,4) на 1 пробу содержала 42 мкмоль $Na_2HPO_4$, 7 мкмоль $KH_2PO_4$, 14 мкмоль α-кетоглутаровой кислоты, 100 мкмоль D, L-аспарагиновой кислоты или D, L α-аланина. Активность НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (ГДГ) определяли по Л. И. Захаровой [3]. Субстратно-буферная смесь (pH 8,2) на 1 пробу содержала 150 мкмоль трис-HCl, 0,3 мкмоль ЭДТА, 0,1 мкмоль НАДФН, 150 мкмоль глутаминовой кислоты. Полученные данные обработаны статистически с помощью программы Statistica 5.5.

### *Результаты исследований и их обсуждение*

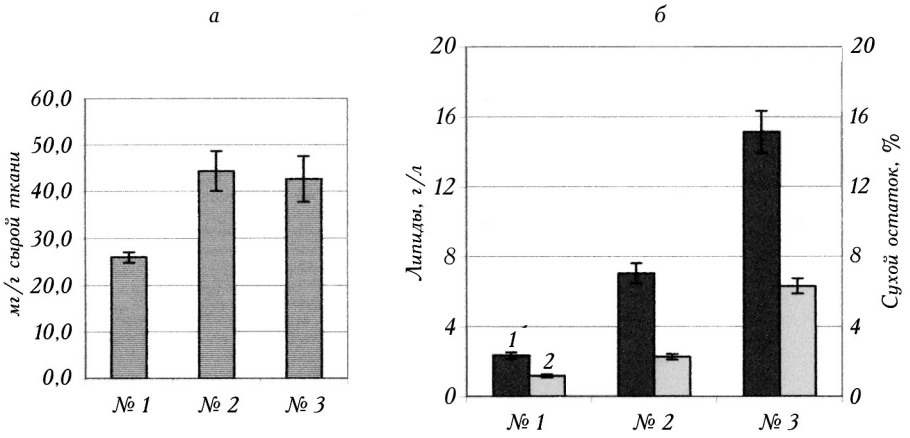
Как показали наши исследования, содержание общего белка в мышцах, печени, жабрах и селезенке рыб, подвергавшихся действию соединений аллохтонного азота, было достаточно стабильным и только в ряде случаев зависело от действия токсиканта. Так, по окончании вегетационного периода в октябре, при прекращении питания и переходе рыб к зимовке в мышцах и печени опытных рыб содержание белков на протяжении всех четырех лет наблюдений соответственно на 4,9—37,8% и 21,7—65,1% достоверно превышало величину данного показателя у контрольных карпов. Это происходило из-за меньшего накопления в тканях рыб энергоемких соединений, преимущественно липидов.

Однако по мере увеличения количества аллохтонного азота в воде существенно возрастало содержание белков в плазме крови — на 64,5—70,7% по сравнению с контролем. Причем значительно (в 1,9—5,4 раза по сравнению с контролем) изменялось количество сухого остатка в плазме крови опытных рыб (рис. 1). Бесспорно, увеличение пула общих белков и других органических соединений в крови свидетельствует об усилении их транспортировки из печени и других белоксинтезирующих органов. Важно отметить дозозависимую закономерность повышения содержания липидов в плазме крови под воздействием высоких концентраций минерального азота в воде, что может быть связано с включением механизмов поддержания резистентности организма к действующему фактору.

Таким образом, у рыб, подвергшихся воздействию азотных соединений, происходили процессы поддержания гомеостаза организма, выведения аммония из внутренней среды. Причем на четвертом году жизни рыб эти механизмы уже настолько активно функционировали, что гибели рыб даже в зимний период не происходило.

Одной из возможных причин, объясняющих изменение величины физиолого-биохимических показателей карпов, являлось усиление обмена веществ у подопытных и контрольных рыб в летний период. У них, как у экзотермных животных, по мере роста температуры внешней среды более интенсивно протекали процессы дезаминирования и трансаминирования, компенсирующие токсическое влияние соединений аллохтонного азота.

Основным и наиболее важным ферментом в системе связывания аммиака в организме рыб, его транспорта и экскреции являются NAD(P)H-зависи-

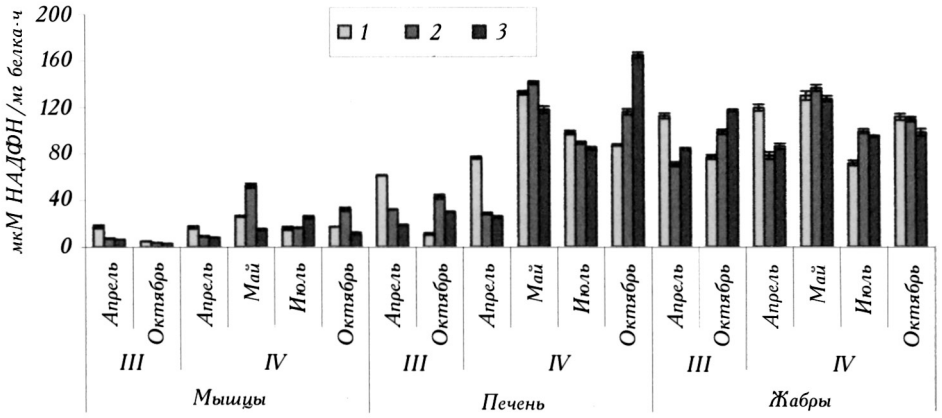



**1.** Содержание белков (*а*), липидов и сухого остатка (*б*) в плазме крови карпов под воздействием избыточного поступления азота в водоемы ($M \pm m$, $n = 7$): *1* — липиды; *2* — сухой остаток.

мые глутаматдегидрогеназы. Другими ферментами, которые выполняют в обмене белков существенную роль, являются ферменты трансаминирования, в частности аланинаминотрансфераза и аспартатаминотрансфераза. Активность этих ферментов была определена нами в печени, мышцах, жабрах самок подопытных и контрольных рыб весной (середина апреля, до начала активного питания), летом и осенью (середина октября, прекращение активного питания и переход к зимовке).

Анализ данных по общей активности глутаматдегидрогеназы (ГДГ) в мышцах, печени и жабрах карпов в различные сезоны года и у рыб разного возраста — трехлеток (молодые особи) и четырехлеток (половозрелые особи) — выявил ряд закономерностей. Во-первых, наблюдалась тканевая специфичность активности ГДГ. В частности, в мышцах этих двух возрастных групп карпов данный показатель в 6—8 раз ниже, чем в других тканях — печени и жабрах (рис. 2). Во-вторых, с наступлением половой зрелости и, соответственно, возникновением ряда существенных изменений в физиологии и биохимии рыб, связанных с формированием половых продуктов, в которых задействованы мощные биосинтетические процессы, изменение гормонального фона и др., значительно возросла активность ГДК в исследованных тканях. Так, в печени на четвертом году жизни рыб она увеличилась в 2—3 раза, в мышцах — в 1,5—2,0 раза. Это свидетельствует об усилении синтеза глутамина. Нами показано, что под действием азотистых соединений водной среды в мышцах рыб депонировано значительное (по сравнению с контролем) количество общего белка. Этот белок в результате катаболизма до аминокислот с последующим их дезаминированием продуцирует эндогенный аммиак, который связывается в глутамин с помощью ГДГ. Об этом свидетельствует рост ее активности в мышцах.

На основании полученных результатов исследований мы пришли к выводу, что сезонные изменения активности ГДГ зависят от уровня аллохтонного азота в водной среде. Активность процессов дезаминирования определя-




**2.** Влияние высоких концентраций аллохтонного азота на активность ГДГ в органах и тканях карпов ($M \pm m$, $n = 7$): *III* — трехлетки; *IV* — четырехлетки. Здесь и на рис. 3: *1* — пруд № 1; *2* — пруд № 2; *3* — пруд № 3.

лась, в первую очередь, уровнем продуцирования эндогенного аммиака, а следовательно, — интенсивностью катаболизма белков в качестве энергоемкого соединения. У рыб интенсивность процессов дезаминирования аминокислот адекватно отражала уровень энергетических процессов и общую активность метаболизма.

В апреле, при действии низких температур (6—10°С), для рыб, еще находящихся на стадии зимовки, и вне зависимости от их возраста (3—4 года), установлена общая закономерность изменений ГДГ-активности. Во всех изученных тканях она существенно ниже у рыб, находившихся под воздействием токсической нагрузки. Наиболее значимая разница в активности ГДГ по сравнению с контролем (более чем в 2 раза) наблюдалась в печени карпов, зимовавших в загрязненных азотистыми соединениями водоемах. Активность ГДГ указывала на более низкий уровень связывания эндогенного аммония в глутамин у опытных рыб. Причем, при совместном действии аллохтонного азота и низких температур происходило достоверное и существенное угнетение этого процесса.

В мае, по мере роста температуры воды и перехода рыб к активному питанию и росту, наблюдалось закономерное для всех тканей повышение ГДГ-активности: в мышцах — в 1,6 раза (пруд № 1) и в 1,8—5,7 раза (пруд № 2, 3), в печени — в 1,7 и 4,6—4,9 раза, а в жабрах — на 8,5 и 47,7—74,3% соответственно. В целом, уровень ГДГ-активности в жабрах рыб был стабильно высоким, не зависел от возраста рыб и демонстрировал значительно меньшую зависимость от действия внешних факторов (сезона, температуры, влияния азотного загрязнения) по сравнению с тем же показателем в мышцах и печени рыб. В период активного нагула рыб, когда наблюдались максимальные темпы их роста и питания, уровень ГДГ-активности в печени и жабрах карпа достоверно снижался. Это происходило из-за того, что у активно питающихся рыб энергообеспечение метаболизма проходило преимущественно за счет катаболизма липидов и гликогена. Катаболизм белков

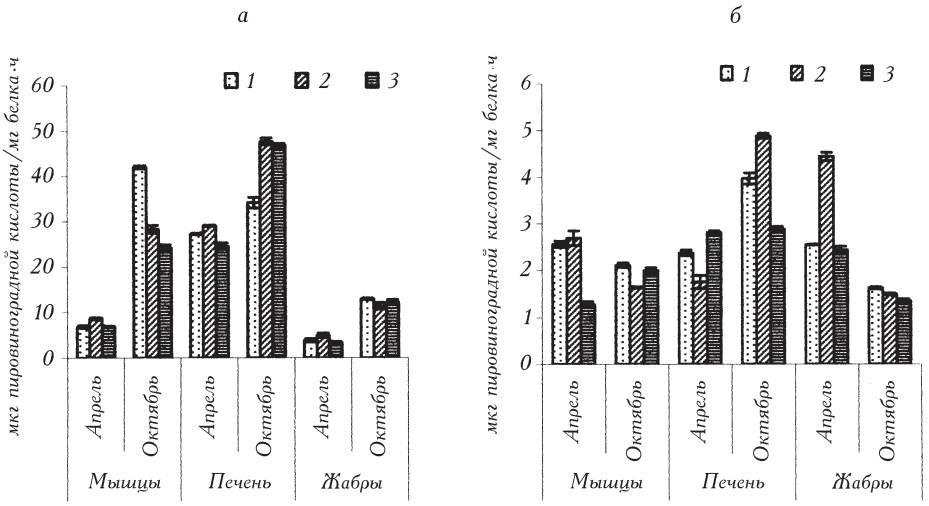
был характерен и преобладал в неблагоприятных или экстремальных условиях (зимовка, стресс, избыточная локомоторная активность, гипоксия).

В октябре, по завершении нагула рыб и переходе их к зимовке, ГДГ-активность в печени карпов, находившихся под действием избыточных концентраций аллохтонного азота, превышала соответствующее значение у контрольных рыб в 1,3—3,9 раза, а в жабрах — в 1,3—1,4 раза на 3-м году жизни рыб или равнялась контрольной величине (4-й год). Это свидетельствует об интенсификации связывания эндогенного аммиака в глутамин. В мышцах величина этого показателя у рыб из загрязненных прудов была более низкой — на 32,0—53,0% по сравнению с контролем. Следовательно, основной (80% или более от общего объема) путь фиксации и экскреции аммония в организме, находившемся под токсической нагрузкой азотистых соединений, активизировался в период высоких температур, нагула рыб и подготовки их к зимовке, а угнетался в условиях неблагоприятной зимовки в загрязненных водоемах.

При сравнении полученных закономерностей изменения сезонной ГДГ-активности со всеми показателями, характеризующими активность метаболизма контрольных и опытных рыб, выясняется, что рыбы из загрязненных азотистыми соединениями водоемов переходили к зимовке в состоянии с большей активностью системы связывания эндогенного аммиака, который образовался в результате катаболизма белков, и с меньшим уровнем накопления энергоемких веществ (липидов, гликогена) [18]. Однако выходили они из зимовки, сохранив большее количество этих веществ в печени и мышцах, чем рыбы, находившиеся в незагрязненной воде. При выходе из зимовки у опытных рыб отмечался значительно меньший уровень активности ГДГ и, в частности, активности ферментативной системы, которая отвечает за экскрецию аммония. Это свидетельствует о том, что, находясь в особо неблагоприятных условиях, когда низкие температуры значительно усиливают токсическое действие соединений аллохтонного азота, рыбы, как экзотермные животные, не могут адекватно повысить активность физиолого-биохимических механизмов противодействия влиянию изучаемого токсиканта. В качестве адекватного ответа на его действие в неблагоприятных условиях максимально снижалась активность общего метаболизма, а соответственно — расхода энергоемких соединений. Основным механизмом противодействия токсикантам в таких условиях становилось максимальное снижение уровня обмена в организме рыб и с окружающей водной средой. Рыбы обездвиживались, сохраняя низкий уровень физиологичной и биохимической активности.

Ряд авторов в процессе исследований отмечали разные сроки и режимы адаптации рыб к действию азотных соединений водной среды [9], однако они получили сходные результаты [15], свидетельствующие о наличии адаптации у рыб и повышении их толерантности [13] при длительном содержании в среде с высокой концентрацией минерального азота.

На основании анализа данных по активности аланин- (АлАТ) и аспартатаминотранферазы (АсАТ) можно отметить, что активность первой из них в метаболизме азотистых соединений была в 3—10 раз выше (рис. 3). Именно




**3.** Влияние высоких концентраций аллохтонного азота на активность аминотрансфераз в органах и тканях карпов ($M \pm m$, $n = 7$): *а* — АлАТ; *б* — АсАТ.

изменения активности этого фермента более четко отражали влияние аллохтонного азота на рыб. Ранней весной при низких температурах воды существенных отличий в активности АлАТ в органах и тканях контрольных и подопытных рыб не наблюдалось. В мышцах и печени этот показатель был соответственно на 25,9 и на 6,9% выше, чем у рыб из «умеренно» загрязненного пруда. Осенью же при аналогичном температурном режиме водоема у подопытных карпов в мышцах активность АлАТ была в 1,5—1,7 раза, а в жабрах — на 5,7—13,1% ниже, чем в контроле. Данный факт дает основание думать, что в таких условиях водной среды тормозятся процессы трансаминирования глутамата и пирувата у рыб. Однако осенью в печени карпов, находившихся в токсичной среде, процессы трансаминирования и экскреции избыточного эндогенного азота были более интенсивными, чем в мышцах. Об этом свидетельствует более высокая активность АлАТ в печени подопытных рыб по сравнении с контролем.

Наиболее существенным является тот факт, что рыбы после продолжительной адаптации к действующим факторам слабо реагировали на влияние аллохтонного азота изменением показателей активности как АлАТ, так и АсАТ в жабрах, одном из наиболее чувствительных к влиянию азотных соединений органе рыб. Судя по активности АсАТ в мышцах, печени и жабрах, рыбы сильнее реагировали на аммоний в концентрации 15—20 мг $N/дм^3$, чем 25 мг $N/дм^3$. При повышении уровня азотистых соединений в воде (выше 25 мг $N/дм^3$) активность АсАТ опытных рыб не отличалась от контрольных значений.

## *Заключение*

В организме рыб, подверженных действию высоких концентраций аллохтонного азота, происходят активные процессы, направленные на связывание и экскрецию аммиака.

В ответ на действие соединений минерального азота и в зависимости от температурных условий среды проявляются два механизма (зимний и летний) адаптации рыб на уровне изменений физиолого-биохимических показателей:

а) в вегетационный период происходит активизация метаболических процессов, в частности увеличение содержания общего белка, повышение активности ГДГ, АлАТ и АсАТ, направленная на противодействие токсическому влиянию соединений азота и его выведение;

б) в зимний период характерно значительное снижение активности метаболических процессов. Однако при этом происходит более значительное накопление азота в организме рыб при их длительном пребывании в загрязненной аллохтонным азотом среде.

**

*Досліджено зміну активності глутаматдегідрогенази, аланін- і аспартатамінотрансферази в органах і тканинах коропа під багаторічним впливом підвищеної концентрації алохтонного азоту. Встановлено, що у риб існує два різні способи (зимовий та літній) фізіологічної адаптації до дії токсичних чинників середовища залежно від температури. Відмічено, що у вегетаційний період спостерігається посилення активності загального метаболізму риб у відповідь на дію азотистих сполук, а при низьких температурах знижується обмін між зовнішнім і внутрішнім середовищем.*

**

*Change in the activity of glutamate dehydrogenase, alanine- and aspartateaminotransferase in the organs and tissues of carp under the prolonged influence of a rather high concentration of allochthonous nitrogen were investigated. It has been found that fishes possess two different ways (wintry and summer) of their physiological adaptation to the influence of toxic factors of the environment depending on a temperature of water. During vegetation period, the activity of the process of metabolism in fishes is response to the influence of the nitrogenous compounds increases, where as at a low temperature of water it decreases.*

**

1. *Грубинко В.В.* Роль глутамина в обеспечении азотистого гомеостаза у рыб (обзор) // Гидробиол. журн. — 1991. — Т. 27, № 4. — С. 46—56.
2. *Грубінко В.В.* Адаптивні реакції риб до дії аміаку водного середовища: Автореф. дис. ... докт. біол. наук. — К., 1995. — 44 с.
3. *Захарова Л.И.* Определение активности глутаматдегидрогеназы в митохондриях тканей животных // Методы биохимических исследований. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. — С. 250—252.
4. *Киризий Т.Я., Бабич Г.Б., Самойлова Т.Д.* Динамика минерального азота в водоемах Дендропарка «Александрия» // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія. — 2005. — № 3 (26). — С. 199—200.
5. *Методические* указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований / Под ред. В. В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1973. — 324 с.

6. *Практикум* по биохимии / Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. — 510 с.
7. *Creach Y.* Protein thiols and free amino acid of carp tissues during prolonged starvation // Arch. Sci. Physiol. — 1966. — Vol. 20, N 1. — P. 115—121.
8. *Creach Y., Vellas F., Bauche G.* Metabolisme azote chez les poissons // Bull. Union of Oceanogr. France. — 1974.— Vol. 6, N 4.— P. 57—59.
9. *Doblander C., Lackner R.* Oxidation of nitrite to nitrate in isolated erythrocytes: a possible mechanism for adaptation to environmental nitrite // Can. J. Fish. and Aquat. Sci. — 1997. — Vol. 54. — P. 157—161.
10. *Forster R.P., Goldstein L.* Formation of excretory products // Fish Physiology. — New York: Acad. press, 1969. — Vol. 1. — P. 313—350.
11. *Kajimura M., Croke S.J., Glover C.N., Wood C.M.* Dogmas and controversies in the handling of nitrogenous wastes: the effect of feeding and fasting on the excretion of ammonia, urea and other nitrogenous waste products in rainbow trout // J. Exp. Biol. — 2004. — Vol. 207, N 12. — P. 1993—2002.
12. *Kaushik S.J., Fauconneau B., Blanc J.M.* A study of nitrogen excretion and oxygen consumption in five half-sib families of rainbow trout // Reprod. nutr. develop. — 1984. — Vol. 24, N 4. — P. 431—438.
13. *Kroupova H., Machova J., Svobodova Z.* Nitrite influence on fish: a review // Vet. Med. Czech. — 2005. — Vol. 50, N 11. — P. 461—471.
14. *Lloyd R.* Pollution and freshwater fish // Fishing News Books. — 1992. — 176 p.
15. *Machova J., Kroupova H., Piackova V. et al.* Acute toxicity of nitrite for fish in relation to chloride concentration in water // Ochrona zdrowia rybaktualne problemy. — 2004. — 275 p.
16. *Moraes G., Polez V.L., Iwama G.K.* Biochemical responses of two Erythrinidae fish to environmental ammonia // Braz. J. Biol. — 2004. — Vol. 64, N 1. — P. 95—102.
17. *Ogata H., Murai T.* Changes in ammonia and amino acid level in the erythrocytes and plasme of carp, Cyprinus carpio, during passage through the gills // J. Exp. Biol. — 1988. — Vol. 33, N 3. — P. 471—479.
18. *Potrohov A.S., Savchenko E.V., Zinkovsky O.G., Zhuk O.* Changes of contents of lipids, glycogen and products of lipid oxidation in carp organs underactions of increased concentration of nitrogen compounds in water // Proc. Ksi ga konferencyjna ECOpole'06 Jamrozowa Polana, Hrades Králové, 19—21.X. 2006. — Opole, 2006. — P. 132—136.
19. *Smutná M., Vorlová L., Svobodová Z.* Pathobiochemistry of Ammonia in the Internal Environment of Fish (Review) // Acta Vet. Brno. — 2002. — Vol. 71. — P. 169—181.
20. *Wood C.M.* Ammonia and urea metabolism and excretion / Ed. by D. H. Ewans // Physiology of fish. — CRC Press Boca Raton, 1993. — P. 379—425.

Институт гидробиологии НАН Украины, Киев Поступила 14.10.08