

УДК 575.876:597.552(546.817:546.171.1:547.304.1)

*В. Д. Романенко¹, О. М. Арсан¹, В. В. Грубінко²,
І. М. Коновець¹, В.О. Арсан³*

**МЕТАБОЛІЗМ АЗОТИСТИХ РЕЧОВИН В ОРГАНІЗМІ
БІЛОГО АМУРА ЗА ДІЇ ЙОНІВ СВИНЦЮ ТА РІЗНОЇ
ТЕМПЕРАТУРИ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА**

Досліджували вміст білка, аміаку, глутаміну, активність глутамінази та глутамінсинтетази в тканинах білого амура за дії йонів свинцю і різної температури водного середовища. Показано, що за підвищеної температури та тривалої дії йонів свинцю інтенсивність утворення аміаку за рахунок розкладу білків, що використовуються на енергетичні потреби, пов'язані з адаптацією, значно перевищує інтенсивність його зв'язування глутамінсинтетазою у нетоксичний глутамін і виведення з організму через зябра.

***Ключові слова:** білий амур, йони свинцю, адаптація, метаболізм, аміак, глутамін, глутаміназа, глутамінсинтетаза.*

В умовах постійного антропогенного навантаження на водні об'єкти в них значно зросла концентрація важких металів, зокрема свинцю. Це пов'язано, насамперед, зі скиданням стічних вод хімічних і металургійних виробництв та викидами транспорту [8]. Показано, що вміст свинцю у водному середовищі становить в середньому 1,0 мкг/дм³ [10].

Наявність йонів свинцю у воді призводить до їх накопичення у тканинах риби [1, 5], що викликає зміни окисно-відновних процесів [1], вмісту глікогену [15], активності трансамінази [2] та обміну вуглеводів [1, 9], а також пошкодження мітохондрій та еритроцитів [9]. Токсичність свинцю для риби залежить від супутніх несприятливих чинників, серед яких найбільш важливими є зміни температури води та інші токсиканти, що можуть формувати синергетичні токсичні суміші з йонами свинцю, наприклад аміак [6]. Токсичність йонів свинцю за таких умов досліджена на корописі (*Cyprinus carpio* L.) [6]. В той же час дія йонів свинцю за різних температур водного середовища на метаболізм азотистих речовин у білого амура практично не встановлена. У зв'язку з цим метою роботи було з'ясування впливу підвищеної концентрації йонів свинцю на загальний вміст білків, аміаку, глутаміну та активність глутамінази і глутамінсинтетази в тканинах білого амура за різної температури водного середовища.

© В. Д. Романенко, О. М. Арсан, В. В. Грубінко, І. М. Коновець,
В.О. Арсан, 2014

Матеріал і методи досліджень. Об'єктом досліджень були особини білого амура (*Ctenopharyngodon idella* Val.), вирощені на Білоцерківській гідробіологічній станції Інституту гідробіології НАН України. Після вилову риб аклімували два місяці до лабораторних умов. По п'ять екземплярів риб масою 250—300 г поміщали у 100-літрові акваріуми, які було заповнено відстояною водопровідною водою та обладнано термо- і газорегуляторами. Задану концентрацію йонів свинцю (500 мкг/дм^3 , що відповідає 5 рибгосподарським ГДК) створювали додаванням у воду розрахункової кількості $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

Для запобігання впливу екзометаболітів на риб та підвищення концентрації йонів свинцю воду змінювали щодоби з додаванням відповідної кількості солі металу. Як контроль використовували досліджувані показники у тканинах риб, які знаходились у воді без додавання йонів свинцю. Вміст кисню у воді акваріумів становив $7,05\text{—}8,27 \text{ мг/дм}^3$, CO_2 — $3,2\text{—}3,4 \text{ мг/дм}^3$, рН $7,5\text{—}7,7$. Досліди проводили при температурі води 20 і 26°C. Впродовж дослідів риб годували гранульованим комбікормом К-III-11.

Тривалість експерименту для формування адаптивних механізмів до дії абіотичних чинників водного середовища, включно і йонів важких металів, становила 7 і 14 діб [9].

Тканини (печінку, зябра, м'язи і нирки) заморожували у рідкому азоті та розтирали у порошок. У тканинах риб визначали вміст білків (мг/г) [14], аміаку (мкмоль/г) [11], глутаміну (мкмоль/г) [11], в зябрах та нирках глутаміназну активність (нмоль/мг білка·хв⁻¹) [12], в печінці та м'язах глутамінсинтетазну активність (нмоль/мг білка·хв⁻¹) [4]. Отриманий цифровий матеріал оброблено статистично з використанням *t*-критерію Ст'юдента [13].

Результати досліджень та їх обговорення

Як показали отримані результати, значення досліджуваних показників, що характеризують метаболізм азотистих речовин у тканинах білого амура, змінюються залежно від тривалості дії свинцю та температури водного середовища. Так, за семидобового перебування риб у токсичному середовищі при 20°C у печінці, зябрах і м'язах загальний вміст білків зменшувався відповідно на 45,0, 45,1 і 40,4% відносно контролю (табл. 1). В той же час у нирках цей показник був на 67% вищим. Зменшення вмісту білків у тканинах може свідчити або про пригнічення їх синтезу, або про використання білкових ресурсів на енергетичні потреби організму, пов'язані з адаптацією риб до дії йонів свинцю. Зростання вмісту білків у нирках за таких умов може відбуватися внаслідок перерозподілу між тканинами та екскреції, що має місце за токсичних патологій у тварин [12].

За сім діб кількість тканинного аміаку в печінці і зябрах білого амура знижувалась відповідно на 25 і 35,7%, а глутаміну в печінці, зябрах та м'язах — відповідно на 20,3, 26,2 і 28,4% порівняно з контролем (табл. 2).

1. Загальний вміст білків (мг/г) у тканинах білого амура за дії йонів свинцю (5 ГДК) при 20°C ($M \pm m, n = 5$)

Умови досліджу	Печінка	Зябра	М'язи	Нирки
Період адаптації 7 діб				
Контроль	18,60 ± 1,20	14,48 ± 1,02	11,46 ± 0,82	16,40 ± 1,30
Дослід	10,23 ± 0,63*	7,96 ± 0,65*	8,61 ± 0,70*	27,38 ± 1,60*
Період адаптації 14 діб				
Контроль	20,14 ± 1,70	15,72 ± 0,80	13,16 ± 0,60	18,28 ± 0,83
Дослід	20,54 ± 1,50	15,87 ± 0,70	13,35 ± 0,50	18,55 ± 0,76

* Тут і в табл. 2—4 відмінності порівняно з контролем вірогідні; «—» — показник не визначали.

2. Показники азотистого обміну в тканинах білого амура за дії йонів свинцю (5 ГДК) при 20°C ($M \pm m, n = 5$)

Тканини	Умови досліджу	Вміст NH ₃ , мкмоль/г	Вміст глутаміну, мкмоль/г	Активність глутамінсинтетази, нмоль/мг білка·хв ⁻¹	Активність глутамінази, нмоль/мг білка·хв ⁻¹
Період адаптації 7 діб					
Печінка	К	4,20 ± 0,40	35,0 ± 1,40	9,40 ± 0,05	—
	Д	3,50 ± 0,40	27,9 ± 1,70*	12,2 ± 0,30*	—
Зябра	К	6,20 ± 0,50	18,0 ± 1,20	—	1,60 ± 0,10
	Д	4,50 ± 0,50*	13,3 ± 1,00*	—	1,80 ± 0,70
М'язи	К	7,80 ± 0,40	22,9 ± 1,80	11,4 ± 0,30	—
	Д	12,1 ± 0,40*	16,4 ± 1,40*	16,8 ± 0,60*	—
Нирки	К	10,6 ± 0,80	10,1 ± 1,20	—	8,70 ± 0,90
	Д	11,4 ± 0,80	10,0 ± 1,10	—	5,50 ± 0,60*
Період адаптації 14 діб					
Печінка	К	2,40 ± 0,40	14,7 ± 1,00	1,50 ± 0,08	—
	Д	3,00 ± 0,20*	23,9 ± 1,20*	1,70 ± 0,01*	—
Зябра	К	2,85 ± 0,10	30,5 ± 0,10	—	10,0 ± 0,10
	Д	3,80 ± 0,20*	33,1 ± 0,20	—	18,2 ± 1,30*
М'язи	К	10,3 ± 0,20	14,6 ± 1,00	1,20 ± 0,01	—
	Д	10,2 ± 0,50	16,0 ± 1,00	0,70 ± 0,05*	—
Нирки	К	11,1 ± 0,50	10,7 ± 0,20	—	17,1 ± 0,40
	Д	8,60 ± 0,60*	26,8 ± 0,10*	—	14,4 ± 1,00*

П р и м і т к а. Тут і в табл. 3 і 4: К — контроль, Д — дослід.

Зниження досліджуваних показників може свідчити про те, що азотисті сполуки активно включаються в обмінні процеси, пов'язані з адаптацією риб до йонів свинцю, на користь чого свідчить також зростання в печінці активності глутамінсинтетази (на 29%), роль якої полягає у зв'язуванні аміаку з метою запобігання аміаковому токсикозу. Поряд з цим, у м'язах білого амура за дії йонів свинцю при 20°C зростав як вміст аміаку (на 55%), так і активність глутамінсинтетази (на 47,3%). На підставі одержаних результатів можна дійти висновку, що за таких умов водного середовища аміак повністю не зв'язується і не виводиться та може спричинити інтоксикацію м'язів.

Слід зазначити, що зі збільшенням часу перебування риб у токсичному середовищі при 20°C до 14 діб загальний вміст білків в усіх тканинах (печінка, зябра, м'язи та нирки) практично не змінюється порівняно з контролем (табл. 1). Однак, на відміну від семидобового періоду адаптації риб до експериментальних умов, вміст аміаку в печінці та зябрах значно (на 25,0 і 35,7%) зростав. У печінці збільшувалась також кількість глутаміну (на 62,5%) при незмінній активності глутамінсинтетази (див. табл. 2). Відмічений факт свідчить про те, що в печінці риб, поряд з глутаміном, накопичується аміак, останнє може призвести до аміакової інтоксикації. Значне накопичення аміаку в зябрах пов'язане зі збільшенням (на 82%) активності глутамінази. За участю глутамінази азот амідної групи глутаміну вивільнювався у вигляді аміаку. Однак вміст глутаміну в зябрах не змінювався (див. табл. 2).

У нирках при адаптації риб протягом 14 діб до дії йонів свинцю (5 ГДК) при 20°C знижувався (на 22,6%) вміст аміаку та одночасно зростав (на 157,6%) вміст глутаміну (див. табл. 2), що свідчить про ефективне зв'язування аміаку глутаміновою кислотою з утворенням глутаміну [12].

Необхідно зазначити, що у м'язах білого амура за експериментальних умов не виявлено змін у всіх досліджуваних показників, за винятком активності глутамінсинтетази, яка знижувалась на 41,7% відносно контролю (див. табл. 2). На підставі цього можна дійти висновку, що наявність йонів свинцю в концентрації 5 ГДК при 20°C води пригнічує через 14 діб активність ферменту у м'язах риб.

Йони свинцю у водному середовищі при 26°C викликали глибші зміни метаболізму азотистих речовин у тканинах білого амура, ніж при 20°C. Так, за 7 діб при 26°C у всіх тканинах риб — печінці, зябрах, м'язах і нирках вміст білків зростав відповідно на 58,0, 28,97, 59,98 та 29,0% порівняно з контролем (табл. 3). При цьому активність глутамінсинтетази в печінці та зябрах знижувалась на 33,4 і 41,0% відносно контролю без вірогідних змін вмісту аміаку та глутаміну (табл. 4).

В зябрах і нирках риб вміст глутаміну зростав відповідно на 22,3 і 27%, а активність глутамінази знижувалася на 23 і 35,3%. Вміст аміаку в цих тканинах не змінювався (див. табл. 4). Отже, можна стверджувати, що він ефективно зв'язується в глутамін, оскільки глутаміназна активність значно знижена. Такий стан запобігає розвитку аміакової інтоксикації.

3. Загальний вміст білків (мг/г) у тканинах білого амура за дії йонів свинцю (5 ГДК) при 26°C ($M \pm m, n = 5$)

Умови досліджу	Печінка	Зябра	М'язи	Нирки
Період адаптації 7 діб				
Контроль	21,50 ± 1,45	17,60 ± 1,10	13,32 ± 0,70	19,12 ± 0,80
Дослід	33,97 ± 1,90*	22,70 ± 1,60*	21,31 ± 1,50*	24,66 ± 1,10*
Період адаптації 14 діб				
Контроль	22,40 ± 1,40	18,40 ± 0,90	14,50 ± 0,40	20,30 ± 0,90
Дослід	18,40 ± 1,20*	12,58 ± 0,50*	15,80 ± 0,60	12,42 ± 0,70*

4. Показники азотистого обміну в тканинах білого амура за дії йонів свинцю (5 ГДК) при 26°C ($M \pm m, n = 5$)

Тканини	Умови досліджу	Вміст NH ₃ , мкмоль/г	Вміст глутаміну, мкмоль/г	Активність глутамінсинтетаз, нмоль/мг білка·хв ⁻¹	Активність глутамінази, нмоль/мг білка·хв ⁻¹
Період адаптації 7 діб					
Печінка	К	3,10 ± 0,10	24,5 ± 0,20	3,00 ± 0,01	—
	Д	3,50 ± 0,10	23,2 ± 0,50	2,00 ± 0,01*	—
Зябра	К	4,90 ± 0,40	16,1 ± 0,20	—	13,1 ± 0,50
	Д	5,30 ± 0,60	19,7 ± 1,20*	—	10,1 ± 0,90*
М'язи	К	7,10 ± 0,40	32,1 ± 0,50	14,4 ± 0,17	—
	Д	6,40 ± 0,30	36,4 ± 0,70	8,50 ± 0,09*	—
Нирки	К	9,70 ± 0,80	15,7 ± 1,30	—	26,7 ± 0,60
	Д	9,90 ± 0,40	20,0 ± 1,10*	—	17,3 ± 1,10*
Період адаптації 14 діб					
Печінка	К	4,50 ± 0,30	50,2 ± 0,20	2,70 ± 0,08	—
	Д	5,40 ± 0,90	52,8 ± 0,50	2,80 ± 0,05	—
Зябра	К	4,00 ± 0,30	46,7 ± 0,80	—	3,7 ± 0,14
	Д	5,00 ± 0,10	42,1 ± 0,50	—	5,00 ± 0,10*
М'язи	К	5,30 ± 0,20	35,3 ± 0,50	3,70 ± 0,14	—
	Д	7,10 ± 0,80	39,2 ± 0,70*	3,40 ± 0,17	—
Нирки	К	3,50 ± 0,20	22,3 ± 1,00	—	9,90 ± 0,10
	Д	7,80 ± 1,20*	15,5 ± 1,00*	—	10,1 ± 0,08

Зі збільшенням періоду адаптації до 14 діб при 26°C метаболізм досліджуваних азотистих речовин в тканинах білого амура істотно змінювався (див.

табл. 3). В печінці, зябрах і нирках риб загальний вміст білків зменшувався на 17,7, 31,6 та 38,8%. Це може бути пов'язано з використанням білків на енергетичні потреби організму риб при адаптації до токсичних умов або пригніченням їх біосинтезу йонами свинцю, вміст якого в тканинах значно зростає [1]. Крім того, показано, що за дії йонів свинцю в концентрації 5 ГДК при 20 і 26°C в печінці активується гліколіз та інгібуються аеробні процеси, а в зябрах посилюються обидва шляхи генерування енергії [1]. У м'язах вміст білків був при цьому майже на контрольному рівні, що можна пояснити його перерозподілом між досліджуваними тканинами.

Аналізуючи вміст білків у тканинах риб при 7- і 14-добовому експерименті при 26°C, можна відмітити фазний характер його змін. Вплив йонів свинцю (5 ГДК) протягом 14 діб при 26°C спричиняє інтоксикацію аміаком всіх тканин, особливо нирок. Його вміст у печінці, зябрах, м'язах і нирках зріс відповідно на 20,3, 25,0, 33,9 та 122,8% (див. табл. 4). Накопичення аміаку за таких умов пов'язано винятково з розкладанням білків, а не глутаміну, оскільки його вміст у тканинах практично не змінювався, а в нирках навіть зростав.

Висновки

Отже, загальний вміст білків, аміаку, глутаміну і активність глутамінази та глутамінсинтетази у тканинах білого амура залежить від температури води та періоду адаптації. Зі зміною цих параметрів водного середовища метаболізм азотистих речовин змінюється у напрямку порушення аміакового балансу. Зі зростанням температури води та тривалості дії йонів свинцю швидкість утворення аміаку внаслідок розкладання білків, що використовуються на енергетичні потреби, пов'язані з адаптацією, є значно більшою, ніж інтенсивність його зв'язування глутамінсинтетазою у нетоксичний глутамін і виведення з організму через зябра за рахунок глутаміназного шляху.

**

Исследовали содержание белков, аммиака, глутамина, активности глутаминазы и глутаминсинтетазы в тканях белого амура под влиянием ионов свинца и температуры водной среды. С возрастанием температуры воды и длительности воздействия ионов свинца скорость образования аммиака за счет разложения белков, которые используются на энергетические нужды, связанные с адаптацией, значительно превышает интенсивность его связывания глутаминсинтетазой в нетоксичский глутамин и выведение из организма жабрами.

**

Content of proteins, ammonia, glutamine, activity of glutaminase and glutaminessynthetase in tissues of the grass carp (Ctenopharyngodon idella) under the impact of lead ions and different temperatures have been investigated. Values of the studied parameters depended on temperature and exposure time. Increase of temperature and exposure time resulted in intensification of ammonia production on account of proteins decomposition related to providing of energy demands on adaptation processes. Rate of ammonia production was higher than rate of its binding by glutaminessynthetase to non-toxic glutamine by glutamine pathway and its excretion through the gills.

**

1. Арсан О. М., Коновець І. М., Арсан В. О. та ін. Динаміка вмісту свинцю, пірувату, лактату та співвідношення вільних НАД-пар в тканинах білого амура за дії іонів свинцю водного середовища // Наук. зап. Терноп. пед. ун-ту. Сер. Біологія. — 2011. — № 1 (46). — С. 77—82.
2. Бабалан Р. Б., Курант В. З., Столяр О. Б., Грубінко В. В. Вплив свинцю (II) на каталітичну активність амінотрансфераз в тканинах коропа // Екологічний стрес і адаптація в біологічних системах: Матеріали I Всеукр. наук. конф., Тернопіль, 1998. — Тернопіль, 1998. — С. 37—38.
3. Воробьев В. И. Микроэлементы и их применение в рыбоводстве. — М.: Пищ. пром-сть, 1979. — 183 с.
4. Евстигнеева З. Г., Грымко Е. А., Асеева К. Б. Определение активности глутаминсинтетазы // Биохимические методы. — М.: Наука, 1980. — С. 84—86.
5. Коновець І. М. Вплив токсикантів на метаболізм аміаку у риб при різних температурах водного середовища: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 1994. — 23 с.
6. Коновець І. М., Кулик В. А., Арсан О. М. та ін. Влияние свинца на азотистый обмен у карпа при различной температуре водной среды // Гидробиол. журн. — 1994. — Т. 30, № 5. — С. 78—86.
7. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
8. Линник П. Н., Набиванец Б. И. Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах. — Л.: Гидрометеиздат, 1986. — 270 с.
9. Никаноров А. М., Жулигов А. В., Покаржевский А. Д. Биомониторинг тяжелых металлов в пресноводных экосистемах. — Л.: Гидрометеиздат, 1985. — 143 с.
10. Свинец в окружающей среде. Гигиенические аспекты. Современные проблемы биосферы / Под ред. Г. И. Сидоренко, П. А. Золотова. — М.: Наука, 1987. — 86 с.
11. Силакова А. И., Труш Г. П., Вилякова А. Я. Микрометод определения аммиака и глутамин в тканевых ТХУ-экстрактах // Вопр. мед. химии. — 1962. — Т. 8, № 6. — С. 538—540.
12. Силакова Г. І., Труш Г. П., Мілонь М. Й. Глютамін і глютамінова активність у функціонально різних частинах нирок // Укр. біохім. журн. — 1960. — Т. 32, № 6. — С. 832—848.
13. Хлебович В. В. Акклимация животных организмов. — Л.: Наука, 1981. — 135 с.
14. Lowry O. H., Rosenbrough N. I., Farr A. L., Randall D. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
15. Shaffi S. M., Qayyum M. A., Goyal R. Lead intoxication tissue glycogen content in a freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* Bloch // Zool. Jahrb. Abt. Ant and Ontog. Tiere. — 1979. — Vol. 101, N 3. — P. 404—406.

¹ Інститут гідробіології НАН України, Київ

² Тернопільський національний педагогічний університет

³ Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК НУБІП України, Київ

Надійшла 14.08.13