

УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ І БІОХІМІЇ ТВАРИН

На правах рукопису

ЯКОВЕНКО БОРИС ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 57.017.73:547.466:597.554.3

МЕТАБОЛІЗМ ГЛІЦИНУ В ОРГАНІЗМІ КОРОПА
ЛУСКАТОГО

03.00.04 - Біохімія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття вченого ступеня
доктора біологічних наук

ЛЬВІВ - 1993

718 28.500
Робота виконана в лабораторії біохімії кафедри хімії
Чернігівського педінституту ім. Т.Г. Шевченка

О ф і ц і я н і о п о н е н т и: доктор біологічних наук,
професор С.Й. Кусень, заслужений працівник вищої школи України,
доктор біологічних наук, професор О.І. Кононський, старший нау-
ковий співробітник, доктор біологічних наук О.М. Арсан

Провідна організація - Харківський державний університет

Захист дисертації відбудеться " _____ " _____ 1993 р.
в _____ год. на засіданні спеціалізованої ради Д 020.14.01 при
інституті фізіології і біохімії тварин Української академії аграрних наук:

Адреса інституту: 290034, м. Львів-34, вул. В. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці інституту
фізіології і біохімії тварин Української академії аграрних наук.

Автореферат розісланий " _____ " _____ 1993 року

Вчений секретар
спеціалізованої ради
кандидат біологічних наук

В.Є. РОБАК

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00802814 (N)

ЛННБ ім. В. Стефаника
АН України

Актуальність теми. На основі досліджень, що проведені в останні роки на різних видах риб, встановлено, що пул вільних амінокислот у цих пойкилотермних тварин відрізняється великою варіабельністю не тільки у порівнянні з теплокровними тваринами, але й між собою. Особливо велика різниця в якісному та кількісному складі амінокислот має місце в білках м'язів риб. На відміну від теплокровних тварин, в м'язах окремих видів риб в значній кількості присутні таурин, саркозин, β -аланін, а також такі дипептиди, як карнозин та ансерин. Деякі види риб взагалі не містять цих дипептидів, незважаючи на те, що в їх м'язах міститься значна кількість складових карнозину та ансерину - β -аланіну та гістидину /Сорвачов, 1982/. Поряд з цим, відомі види риб, що містять карнозину та ансерину дуже мало, відсутні у них і амінокислоти, що складають ці дипептиди. М'язи таких видів риб, як правило, багаті на гліцин, α -аланін та глутамін. Так, риби з ряду окуне- та камбалоподібних відрізняються значною кількістю глутаміну. В м'язах риб, що живуть в Білому морі переважає гліцин та α -аланін /Сорвачов, Шатуновський, 1968 /. У цукрових та багатьох інших прісноводних видів, у тому числі й у коропа лукастого, домінуючими амінокислотами м'язів є гліцин і гістидин /Knapp, Wieser, 1981 /. Лише в окремих риб відмічена підвищена кількість проліну /Мелькова, 1967/ та лейцину /Лясускене, 1977/.

Різноманітний пул вільних амінокислот в м'язах морських риб та тварин. В одних переважає гістидин, α -аланін і гліцин /Муравська, Фанта, 1985/, в інших - тільки гістидин /Sakaguchi, Murata, 1986/. Але в більшості випадків домінує гліцин / Al-Habbib Ome, Al-Habbib Wiidan, 1977; Henriche, Farrington, 1979; Senator e.a., 1979; D'Aniello, 1980; Felbeck, 1980 /.

Отже, в м'язевій тканині прісноводних і морських видів риб у переважній більшості домінують амінокислотами є гліцин. Аналогічна ситуація має місце й у коропа лукастого. Що стосується причин такого явища та шляхів перетворення даної амінокислоти у риб, то це питання не вивчено. Розроблені схеми основних шляхів перетворення вільних амінокислот складені, головним чином, для теплокровних тварин. При цьому передбачається, що й у риб ці схеми такі ж. Але зважаючи на те, що в організмі риб існує значна різноманітність азотних екстрактивних сполук /Сорвачов, 1982/, то у представників класу риб цілком можливі відхилення від загальних схем метаболізму вільних амінокислот, і зокрема гліцину.

Мета і завдання досліджень. Основною метою нашої роботи було вивчення шляхів надходження гліцину в організм коропа, залежність вмісту досліджуваної амінокислоти в м'язевій тканині та гепатопанкреасі риб від концентрації її в оточувувачому середовищі, від температури води та в умовах зимового та весняного голодування. Разом з цим досліджувався вплив бичого інсуліну на динаміку вільних амінокислот, у тому числі й гліцину в тканинах коропа, активність ферментів дезамінування гліцину, глутамінсинтетази та ферментів енергетичного обміну лактат-, ізоцитрат-, сукцинат- та малатдегідрогеназ. Досліджувалась активність "малих"-ензимів, а також таких ферментів гліюксилатного циклу як ізоцитратаза та малатсинтетаза. Значна увага була приділена вивченню неферментативних та ферментативних реакцій конденсації продукту окислювального дезамінування гліцину - гліюксилату з α -кетоглутаратом, оксаоацетатом та піруватом, а також перетворення гліюксиллової кислоти в гліюксилаткарболігазній реакції.

Для в'яснення поставлених вище питань досліджувалися:

- вплив голодування на вміст гліцину та інших вільних амінокислот в білих м'язах та гепатопанкреасі коропових риб при температурі 18-20°C;
- сезона динаміка гліцину у водоймищах та м'язевій тканині коропа;
- шляхи поглинання гліцину з водного середовища організмом коропа;
- вплив бичого інсуліну на динаміку вмісту вільних амінокислот /у тому числі гліцину/, аміаку, гліюкси та ліпідів в м'язах риб;
- глутамінсинтетазна активність м'язів та гепатопанкреасу коропа в умовах голодування при температурі 18-20°C;
- вплив різних концентрацій гліцину на глутамінсинтетазну активність м'язів та гепатопанкреасу;
- активність ферментів переамінування гліцину з α -кетоглутаратом, оксаоацетатом, піруватом та АСТ і АЛТ в досліджуваних тканинах коропа;
- активність гліюксиллоксидази, дезамінувчих НАД- і НАДФ-залежних дегідрогеназ в м'язах та гепатопанкреасі та їх клітинна локалізація;
- інтенсивність ферментативних і неферментативних реакцій конденсації гліюксилату з α -кетоглутаратом, оксаоацетатом і піруватом;
- швидкість гліюксилаткарболігазного перетворення гліюксиллової кислоти в м'язах та гепатопанкреасі коропа;
- активність ферментів енергетичного обміну: ДДГ, іЩДГ, САГ та МДГ в м'язевій тканині та гепатопанкреасі досліджуваних риб;

- можливість перетворення малату в реакції окислювального декарбоксілювання та утворення його в реакції відновного карбоксилювання пірувату за участю "малік"-ензимів в м'язах та гепатопанкреасі;
- активність синтетази малату та цитрату, клітина локалізація малат-синтетази, вплив рН середовища та катіонів двоцвалентних металів на активність даного ферменту;

Наукова новизна роботи. В результаті проведених досліджень встановлено, що білі м'язи коропа здатні накопичувати в значній кількості найпростішу амінокислоту - гліцин. Акумуляцію цієї амінокислоти в м'язах сприяє значна концентрація її в окремі періоди у водоймищах, а також зниження температури води в осінньо-зимовий період. Нагромадження гліцину в м'язах коропа контролюється інсулярним апаратом гепатопанкреасу. В умовах зимового та весняного голодування риби при підвищенні температури води у водоймищах серед вільних амінокислот м'язової тканини найбільше використовується саме ця амінокислота.

Доведено, що гліцин в м'язах та гепатопанкреасі коропа не вступає в реакції переамінування з α -кетоглутаратом, оксалоацетатом та піруватом. В досліджуваних тканинах коропа діють власне гліцинооксидаза та дезамінувчі НАД- і НАДФ-залежні дегідрогенази. Наслідком активності зазначених ферментів гліцин пляхом окислювального дезамінування перетворюється в гліюксилат. В м'язовій тканині коропа цей процес відбувається в 5 разів швидше, ніж в гепатопанкреасі. При аклімації риби до температури $-2-3^{\circ}\text{C}$ швидкість окислювального дезамінування гліцину в м'язах риби вище, ніж при аклімації до температури $+7-8^{\circ}\text{C}$.

На прикладі коропа лускатого вперше доведено, що гліюксилатна кислота, яка утворюється внаслідок окислювального дезамінування гліцину, швидко /особливо в гепатопанкреасі/ перетворюється за участю залежної від тиамінпірофосфату та відновленого НАД гліюксилаткарболігази. Фермент може перетворювати гліюксилат в досить широких межах рН: від 6,0 до 9,0.

Поряд з висказаним, також вперше, виявлено наявність малат-синтетази та ізоцитратази, що свідчить про функціонування в досліджуваних тканинах риби гліюксилатного циклу.

Новим є і виявлення в організмі коропа НАДФ-залежної МДГ [декарбоксилювчої оксалоацетат], відомої під назвою "малік"-ензиму, або "яблучного" ферменту, який традиційно вважається рослинним ферментом.

Сказане вище, та наявність малатсинтетазної реакції, значна

активність МДГ та НАДФ-залежної МДГ [декарбоксилювчої оксаоацетат] дає підставу вважати, що в досліджуваних тканинах коропа функціонує простий, але досить ефективний цикл дикарбонових кислот. "Паливом" для роботи останнього є гліюксилат, утворений з гліцину, якого в м"л-зах коропа накопичується в передзимовий період більше, ніж інших вільних амінокислот.

Практичне значення роботи. Одержані результати по живченню перетворення гліцину в організмі коропа лускатого є теоритичним доповненням існуючого уявлення щодо обміну найпростішої амінокислоти - гліцину в організмі риб. Гліцин не підлягає переамінуванню з катокислотами / α -кетоглутаратом, оксаоацетатом та піруватом/, а дезамінується шляхом окислювального дезамінування як власне гліциноксидазов, так і дезамінувчими НАД- і НАДФ-залежними дегідрогеназами. Поряд з цим, подальше перетворення вуглецевого скелету гліцину, що являє собою гліюксилу кислоту, відбувається в досліджуваних тканинах риб в гліюксилаткарболігазній реакції та використовується в синтезі мадату. Таким чином, гліцин в організмі коропових риб відіграє надзвичайно важливу фізіологічну роль, як джерело енергії і як субстрат, з якого можуть бути синтезовані вуглеводи та жири. Виходячи з цього, одержані дані можуть бути теоритичнов основою використання вільного гліцину, як добавки до раціонів при вирощуванні коропових риб в умовах штучного розведення, особливо при підготовці риб до зимового голодування в природніх умовах. Відомо, що їжа, збагачена на гліцин, робить її дуже привабливою / *Murofushi, Iga, 1985* /, тобто дана амінокислота виконує роль харчового стимулятора. Останнє може підвищити оплату корму.

Апробація роботи. Результати дисертаційної роботи доповідались на 4-му Українському біохімічному з'їзді /Київ, 1982/, 5-му Всесоюзному біохімічному з'їзді /Москва, 1986/, 5-му Українському біохімічному з'їзді /Київ, 1987/, 1-му симпозиумі по екологічній біохімії риб /Ярославль, 1987/, Всесоюзній нараді по екологічній енергетиці тварин /Суздаль, Пушино, 1988/, 6-му Українському біохімічному з'їзді /Київ, 1992/.

Публікації. По матеріалах дисертації опубліковано 27 наукових праць у вигляді статей і тез.

Структура і об'єм роботи. Дисертація містить 320 сторінок машинописного тексту і складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, власних досліджень і їх обговорен-

ня, висновків, практичних пропозицій та списку використаної літератури, в якому приведено 410 робіт вітчизняних і зарубіжних дослідників. Робота ілюстрована 29 рисунками і вміщує 17 таблиць.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для виконання поставленої мети була проведена серія дослідів по вивченню динаміки вмісту гліцину в м'язевій тканині та гепатопанкреасі коропа, а також в різних внутрішніх водоймищах. Вивчалось всмоктування гліцину кишковим трактом коропа, вплив голодування та бичого інсуліну на вміст досліджуваної амінокислоти в білих м'язах та гепатопанкреасі. Проведено також серію дослідів як з участю ферментів, так і в неферментативних умовах, які дали можливість зробити висновки про шляхи перетворення гліцину в організмі коропових риб.

Перший дослід був проведений по вивченню кількісних змін гліцину та інших вільних амінокислот в м'язах та гепатопанкреасі коропа в період зимового голодування, що диктувалось умовами їх природнього перебування. Експеримент проведено в кінці третьої декади квітня на статтєво незрілих рибах на базі рибхвзу "Борцівка" Тернопільської області.

Дослідження сезонної динаміки концентрації гліцину у водоймищах та м'язевій тканині коропа протягом року здійснювалось в двох різних регіонах України: на базі Борцівського рибокомбінату Тернопільської області і "Водопостачавчого ставка" Чернігівського рибозпідприємства.

Дослід по всмоктуванню гліцину кишковим трактом коропа був проведений методом його перфузії розчинами, що містили гліцин, після чого визначали вміст вільної амінокислоти в тканинах переднього, середнього та заднього відділів кишечника, гепатопанкреасі та м'язах.

В різні пори року проводились дослідження по поглинанню гліцину організмом коропа з оточуючого середовища при різних температурах: спочатку перед зимовим голодуванням, в жовтні місяці, потім, через місяць, коли температура води у водоймищах становила 4-5°C і вміст вільного гліцину в організмі риб знизився. Третій дослід по поглинанню амінокислоти з води організмом коропа було проведено в січні-лютому, при температурах 0-4°, 10° і 20°C. Експерименти проведені в умовах акваріуму. В перших двох дослідях формувались 3 групи риб, по 5 екземплярів в кожній з однакових вагов і віком. Перша група була контрольована і утримувалась в звичайній воді. Друга поміщалась в акваріум з водов, в яку був внесений гліцин в кількості 500 мкмоль/л. Третя

група риб утримувалась у воді, в яку був внесений гліцин і хлорид натрію в кількості 500 і 40 мкмоль/л відповідно. Кожна група риб утримувалась у відповідних акваріумах на протязі шести днів, в третьому досліді - 10 днів. По закінченні дослідів риби були забиті, а м'язи, зябра, гепатопанкреас та кишечник були досліджені на вміст вільного гліцину.

Вплив бичого інсуліну на вміст деяких метаболітів у м'язах коропа досліджувався в березні місяці при температурі води 5-7°C. 20 коропів-двохрічок з середньов вагов 400 г були розподілені на 3 дослідні та одну контрольну групи риб по 5 особин в кожній. Інсулін в кількості 0,5 м.о. на 1 кг живої ваги був введений у м'язи біля хвостового плавника. Час дії гормону в кожній окремій групі становив 1, 3 і 5 годин. Після цього в м'язевій тканині коропів визначався вміст вільних амінокислот, у тому числі й гліцину, а також ліпідів, глікози та аміаку.

В експериментах по дослідженню активності глутамінсинтетези в тканинах коропа в умовах голодування використовувались річні коропи середньов вагов 200 г. Активність ферменту визначалась у весняний період трічі: після періоду адаптації риб до температури 18-20°C, після 20- та 40 днів голодування при даній температурі. В кожному досліді використовувалось 5 особин. Матеріалом для досліджень служили гепатопанкреас, м'язева тканина та зябра.

Друга серія досліджень була спрямована на виявлення шляхів перетворення гліцину в організмі коропа. Спочатку в цьому напрямку досліджувалась можливість участі гліцину в реакціях переамінування з такими кетокислотами як піруват, оксалоацетат та α -кетоглутарат. Визначалась також активність АСТ і АЛТ. Вказані досліді були проведені в період зимового голодування риб після адаптації їх до температури води 10°C.

В квітні місяці після закінчення періоду зимового голодування, коли інтенсивно використовуються вільні амінокислоти, проведено дослідження по окислювальному дезамінуванню гліцину.

В кінці жовтня було досліджено вплив температури аклімації риб на швидкість окислювального дезамінування гліцину гепатопанкреасом і білими м'язами. Для цього було сформовано дві групи риб по 10 особин у кожній. Одна група була аклімована до температури -2-3°C, друга - до +7+8°C. Період аклімації продовжувався 30 днів, після чого визначалась активність ферментів окислювального дезамінування гліцину дезамінувчими НАД- і НАДФ-залежними дегідрогеназами, а також власне

гліцинооксидазов в присутності ФАД і вітаміну В₂. Швидкість окислювального дезамінування гліцину з участю вказаних ферментів досліджувалась на гомогенатах, цитоплазматичній фракціях гепатопанкреасу та білих м'язів.

Третя серія дослідів була спрямована на вивчення перетворень продукту окислювального дезамінування гліцину в досліджуваних тканинах - гліоксилової кислоти. При цьому досліджувались реакції конденсації гліоксилату з α -кетоглутаратом, оксалоацетатом і піруватом в ферментативних і неферментативних умовах. Визначалась активність гліоксилаткарболігези, ізоцитратази, глутамінсинтетази, малат- і цитратсинтеза. Поряд з цим проводилось дослідження активності таких окислювальних ферментів як МДГ, ЛДГ і ПДГ, а також МДГ [декарбоксілювчої оксалоацетат]. При вивченні активності вказаних ферментів використовувались мітохондрії, цитоплазма / саркоплазма/, а також частково очищені білкові препарати досліджуваних фракцій.

Визначення вільних амінокислот в тканинах коропа і водоймищах здійснювалось за допомогою амінокислотного аналізатора ААА 881 згідно методики, описаної в інструкції до приладу. Активність АТФ-ази відповідно по методу /Кондрашова і ін., 1965/, кількість аміаку мікродифузним шляхом в чашках Конвея по Зелігсону /1951/, використовувачи чутливий фенолгіпохлоридний реактив. Екстракції ліпідів з досліджуваних тканин здійснювали по Фолчу /1957/, розділяли на окремі фракції з допомогою ТМХ на селікагелі /Шталь, 1965/. Окремі фракції фосфоліпідів визначали по фосфору / Barlett, 1959/, глюкозу по Хултману /1959/. Екстракції глутамінсинтетази з досліджуваних тканин здійснювали розчином 0,005 М NaHCO_3 -0,15 М NaCl . Активність ферменту визначали по кількості ортофосфату, що утворювався в реакції синтезу глутаміну / Пушкін і ін., 1972/.

Дослідження реакцій переамінування гліцину з кетокислотами, активність АСТ і АЛТ проводили по методу, запропонованому Пасхінов Т.С. /1974/. Інкубаційне середовище для визначення активності ферментів окислювального дезамінування гліцину /та інших амінокислот/ було таким, як пропонує / Biochemica information, 1975 /. Активність ферментів виражали в мкг NH_3 на мг білку. Ферментним препаратом в обох випадках служив супернатант, одержаний після центрифугування гомогенатів при 18000 г.

Реакції конденсації гліоксилату з α -кетоглутаратом, оксалоацетатом і піруватом вивчали з білкових фракцій, що осаджується при 50% насичені $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ супернатанту, одержаного після центрифугу-

вання гомогенату при 18000 g і діалізованого протягом ночі проти 0,02 М К-фосфатного буфера по методу / Окума, 1965 /, застосовувчи ТШХ на пластинках "Silufol" /Лисняк, 1981/.

Гліюксилаткарбологіазне перетворення гліцину вивчали за методом / Badour, Waugood, 1977 /, використовувчи "грубі" /не діалізовані/ та частково діалізовані супернатанти.

Виділення та очистку малат- і цитратсинтеаз здійснювали по / Yamamoto, Beevers, 1967 /, активність по / Stadtman, 1957 /.

Активність МДГ, ДДГ та іЦДГ визначали загально прийнятими методами по швидкості окислення НАДН·Н⁺ та відновлення НАДФ при 340 нм, СДГ -- по інтенсивності відновлення 2,6 ДХІІФ в присутності феназінметасульфату і ціаніду калію при 600 нм. Активність МДГ [декарбоксилувчої оксалоацетат] визначали так, як показано в роботі / Swierczynski e.a., 1980 /, ізоцитратази / Dixon, Kornberg, 1959 /.

Виділення мітохондрій з білих м'язів та гепатопанкреасу коропа здійснювалось по загальнопринятій методиці. Кількість білку в пробах при визначенні активності ферментів здійснювали по Лоурі /1951/.
Всі цифрові дані статистично опрацьовані за Оявіним /1961/.

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

І. Вплив голодування на вміст гліцину та інших вільних амінокислот в білих м'язах і гепатопанкреасі коропа

Проведений дослід показав /табл.І/, що після зимівлі в природних умовах і адаптації до умов акваріуму перед проведенням досліді по голодуванню при підвищеній температурі в м'язах коропа серед вільних амінокислот більше всього міститься гліцину.

Після 40 днів голодування при підвищеній температурі відбувається різке зменшення кількості вільних амінокислот. Але найбільше, майже в 7,2 рази, зменшився вміст гліцину. Паралельно з цим, спостерігається поява в м'язах коропа лізину та аспарагінової кислоти.

Оскільки дослід був проведений на статтєво незрілих рибах і вплив нересту був виключеним, то зменшення кількості вільних амінокислот, і в першу чергу вільного гліцину можна пояснити перш за все використанням цих сполук на енергетичні потреби /в умовах досліді при температурі 18-20°C риба здійснювала швидкі рухи в пошуках їжі/. Такий висновок до деякої міри підкріплюється даними активності мітохондріальної АТР-ази м'язової тканини. Виявлено, що від 0° до 10°C

активність даного ферменту зростає в 2,4 рази і від 10° до 20°С - це в 1,5 рази. Таким чином, можна вважати, що з посиленням рухомості

Таблиця I

Зміни кількості вільних амінокислот в м'язах коропа в умовах голодування при температурі 18-20°С / в мкмоль на 1 г сухої тканини, n=5, M ± m /

Амінокислоти	: Після зимівлі в природних умовах	: Після 40 днів голодування в умовах акваріуму	: Р
Цистеїн	-	-	
Лізин		1,27 ± 0,11	
Гістидин	2,77 ± 0,26	сл.	
Аргінін	0,71 ± 0,57	сл.	
Аспарагінова кислота	сл.	4,51 ± 0,38	
Серин	2,39 ± 0,09	1,43 ± 0,05	< 0,001
Гліцин	17,33 ± 0,13	2,40 ± 0,27	< 0,001
Глутамінова кислота	2,11 ± 0,14	1,56 ± 0,07	< 0,5
Треонін	3,38 ± 0,50	сл.	
Аланін	4,83 ± 0,22	1,68 ± 0,11	< 0,001
Пролін	сл.	-	
Тирозин	сл.	сл.	
Метіонін	сл.	сл.	
Валін	2,39 ± 0,26	1,02 ± 0,00	< 0,01
Фенілаланін	сл.	сл.	
Лейцин	1,94 ± 0,04	1,07 ± 0,15	< 0,01
Ізолейцин	сл.	сл.	

риб підвищується використання енергії АТР, для відновлення якої метаболізуються вільні амінокислоти. В процесі голодування риб серед останніх найбільше використовується гліцин.

Що стосується гепатопакрису, то тут картина децю інша. З таблиці 2 видно, що на відміну від м'язів, де домінують вільні амінокислоти є гліцин, в тканині даного органу більшу частину становлять лейцин, аланін, глутамінова кислота та фенілаланін. Через 40 днів голодування кількість більшої кількості вільних амінокислот, в тому числі й гліцину, а також тих, що домінують в цьому органі, на відміну від білих м'язів, зменшується в середньому в 2 рази.

Дослідження показали, що гліцин є домінуючою амінокислотою у

інших мешканців внутрішніх водоймиць - білого амура та товстолобика. Зміни в амінокислотному складі, що відбуваються в м'язах та гепато-панкреасі цих риб в період голодування такі ж, як і у коропа.

Таблиця 2

Вплив голодування на вміст вільних амінокислот в гепатопанкреасі коропа при температурі 18-20° С /в мкмоль на 1 г сухої тканини, n=5, M ± m /

Амінокислоти	: Після зимівлі в природних умовах :	: Після 40 днів голодування в умовах акваріуму :	P
Цистеїн	-	-	
Лізин	3,15 ± 0,18	1,42 ± 0,33	< 0,01
Гістидин	3,10 ± 0,58	1,90 ± 0,30	< 0,2
Аргінін	1,30 ± 0,15	0,62 ± 0,08	> 0,5
Аспарагінова кислота	0,93 ± 0,03	3,91 ± 0,39	< 0,01
Серин	8,48 ± 0,60	4,48 ± 0,48	< 0,01
Гліцин	6,40 ± 1,11	2,93 ± 0,15	< 0,05
Глутамінова кислота	11,62 ± 0,43	5,31 ± 0,72	< 0,01
Треонін	8,40 ± 0,10	3,44 ± 0,46	< 0,001
Аланин	11,76 ± 0,58	7,53 ± 0,71	< 0,01
Пролін	сл.	сл.	
Тирозин	сл.	сл.	
Метіонін	1,90 ± 0,10	сл.	< 0,001
Валін	8,98 ± 0,23	6,58 ± 0,46	< 0,02
Фенілаланін	11,30 ± 1,98	5,43 ± 0,12	< 0,02
Лейцин	13,05 ± 0,39	6,26 ± 0,94	< 0,01
Ізолейцин	3,13 ± 0,09	2,98 ± 0,11	< 0,5

На основі одержаних даних та повідомлень інших авторів можна зробити висновок про те, що окремі види риб, і зокрема короп лускатий, здатні накопичувати в м'язевій тканині найпростішу амінокислоту /і в меншій мірі інші амінокислоти/, утворюючи своєрідне депо азоту та як енергетичний матеріал для використання їх в період зимового голодування.

2. Сезона динаміка гліцину у водоймищах та м'язах коропа

Дослідження, проведене на двох різних прісноводних водоймищах

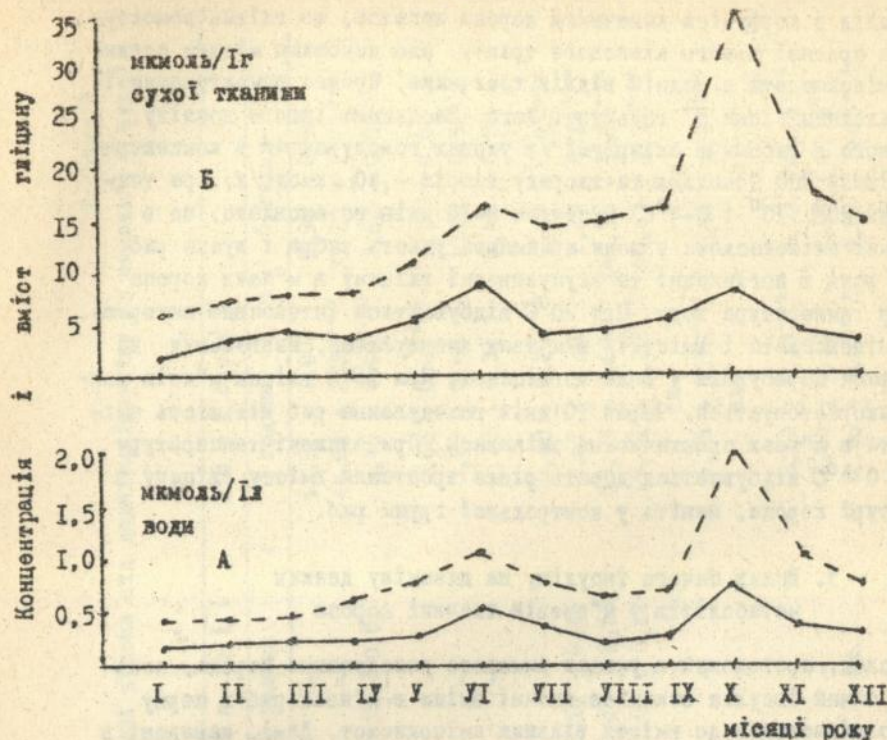


Рис. 1 Динаміка вмісту гліцину у воді /А/ та м'язах коропа /Б/ Борщівського рибкомбінату /---/ та Чернігівського рибозплідника /—/

України /Борщівського рибкомбінату Тернопільської області та "Водопостачавчого ставка" Чернігівського рибозплідника/, показали /рис. 1/, що вміст гліцину в них коливається протягом року в широких межах: від 0,3 до 2,06 мкмоль/л у водоймиці Борщівського рибкомбінату та від 0,1 до 0,74 мкмоль/л у "Водопостачавчому ставку" Чернігівського рибозплідника. Але характерною особливістю в динаміці гліцину обох водоймиць - є поява двох піків концентрації гліцину: меншого в липні та більшого в жовтні. Особливо чітко це спостерігається у водоймиці Борщівського рибкомбінату.

Що стосується м'язової тканини коропа, то вміст гліцину в ній практично відображає динаміку рівня останнього у воді досліджуваних водоймиць. Слід зазначити, що між концентрацією даної амінокислоти у воді та вмістом її в м'язах риб спостерігається пряма залежність.

Дослід з перфузією кишечника коропа показав, що гліцини всмоктується на протязі всього кишкового тракту, але основним місцем поглинання амінокислоти є задній відділ кишечника. Процес всмоктування її є Na-залежним, іони K^+ гальмують його. За даними іншого досліді, проведеного з рибами в акваріумі /в умовах голодування/ з концентрацій гліцину 500 мкмоль/л та хлориду натрію - 40 мкмоль/л, при температурах 20°, 10° і 0-4°C протягом 6-10 днів встановлено, що в поглинанні амінокислоти з води приймають участь зябра і луска риб. Суттєву роль в поглинанні та акумулюванні гліцину в м'язах коропа відіграє температура води. При 20°C відбувається інтенсивне використання амінокислоти і вміст її в м'язах зменшується, незважаючи на те, що риби перебували у воді з гліцином. При 10°C гліцини м'язів майже не використовується. Через 10 днів голодування риб кількість амінокислоти в м'язах практично не змінилась. При зниженні температури води до 0-4°C відбувається досить різке зростання вмісту гліцину в мускулатурі коропа, навіть у контрольній групі риб.

3. Вплив бичого інсуліну на динаміку деяких метаболітів у м'язевій тканині коропа

Дослід, проведений в умовах зимового голодування коропа, показав, що бичий інсулін викликає значні зміни в м'язах риб в першу чергу по відношенню до вмісту вільних амінокислот. Дані, наведені в таблиці 3 показують, що протягом першої години дії гормону відбувається різке зменшення кількості вільних амінокислот. Більшість з них за цей час зникли зовсім. Вміст гліцину, на відміну від інших амінокислот, за цей час, навпаки, збільшився /до 43,85±2,45 проти 34,97±2,50 мкмоль/Іг сухої тканини/. Через 3 години дії інсуліну II амінокислот виявляється в м'язах знову. При цьому, деякі з них знаходяться навіть в більшій кількості, ніж в контрольній групі риб. Серед всіх вільних амінокислот як у порівнянні з контролем, так і з першою годиною дії гормону продовжується збільшення кількості гліцину. Вміст його становить вже 54,03±3,60 проти 34,97±2,45 і 43,85±2,80 мкмоль/Іг сухої тканини м'язів відповідно. Через 5 годин після введення інсуліну вміст окремих амінокислот зменшується у порівнянні з тою групою риб, в яких дія гормону тривала 3 години. Вміст інших амінокислот - за цей час продовжує зростати і стає більшим як у порівнянні з контролем, так і з тою групою риб, де гормон діяв 3 години. Але найбільше зросла кількість гліцину. Через 5 годин його стало вже 141,35±5,80 мкмоль/Іг сухої тканини. Це в 4 рази більше,

Таблиця 3

Вміст вільних амінокислот в м'язевій тканині коропа під впливом інсуліну /в мкмоль/І г сухої тканини, $M \pm m, n=5/$

Амінокислоти	Т е р м і н д і ї г о р м о н у			
	Контроль	І година	3 години	5 години
Лізин	7,32 \pm 0,65	-	11,97 \pm 1,00 ⁺	5,98 \pm 0,50
Гістидин	22,78 \pm 0,50	-	44,64 \pm 2,30 ⁺⁺⁺	35,20 \pm 1,75 ⁺⁺⁺
Аргінін	2,25 \pm 0,01	2,30 \pm 0,02	2,46 \pm 0,02 ⁺⁺⁺	2,62 \pm 0,03 ⁺⁺⁺
Аспарагінова кислота	1,74 \pm 0,01	-	6,66 \pm 0,05 ⁺⁺⁺	1,74 \pm 0,02
Треонін	2,91 \pm 0,50	-	3,09 \pm 0,48	4,14 \pm 0,52
Серин	7,29 \pm 0,30	-	7,10 \pm 0,31	6,48 \pm 0,28
Глутамінова кислота	2,11 \pm 0,14	-	6,08 \pm 0,20 ⁺⁺⁺	6,69 \pm 0,25 ⁺⁺⁺
Пролін	2,38 \pm 0,16	2,10 \pm 0,14	2,67 \pm 0,20	1,29 \pm 0,12 ⁺⁺⁺
Гліцин	34,97 \pm 2,45	43,85 \pm 2,50	54,03 \pm 3,60 ⁺⁺	141,35 \pm 5,80 ⁺⁺⁺
Аланін	11,23 \pm 1,00	3,00 \pm 0,22	15,31 \pm 1,20 ⁺⁺⁺	40,43 \pm 2,30 ⁺⁺⁺
Цистеїн	сл.	-	сл.	сл.
Валін	2,15 \pm 0,26	-	6,26 \pm 0,30 ⁺⁺⁺	4,46 \pm 0,27 ⁺⁺⁺
Метіонін	сл.	-	сл.	сл.
Ілейцин + Ізолейцин	1,92 \pm 0,04	-	5,60 \pm 0,15 ⁺⁺⁺	8,93 \pm 0,25 ⁺⁺⁺
Тирозин	1,16 \pm 0,15	-	1,08 \pm 0,10	2,07 \pm 0,18 ⁺⁺
Фенілаланін	2,00 \pm 0,02	сл.	2,86 \pm 0,03 ⁺⁺⁺	3,07 \pm 0,03 ⁺⁺⁺

Примітка: значення достовірні по відношенню до контролю + < 0,05-0,02; ++ < 0,01; +++ < 0,001

них в контролі.

Експерименти, що проведені на рибах свідчать про те, що інсулін стимулює анаболічні процеси у цих тварин в основному так, як і у ссавців /Торп, 1977; Carneiro, Magal, 1984/. Враховуючи це, можна сказати, що серед вільних амінокислот білих м'язів коропа, як і у ссавців, є чутливі і нечутливі до інсуліну амінокислоти. При цьому, особливо слід виділити гліцин, як дуже чутливу до даного гормону амінокислоту, вміст якої збільшувався протягом всього періоду дії гормону. Можна також стверджувати, що надходження та акумулювання гліцину в м'язах коропа контролюється інсулярним апаратом гепатопанкреасу.

Значний вплив здійснив інсулін і на вміст нейтральних жирів. Якщо в контрольній групі риб вони становили 55,1%, то через 3 години - всього 11,6%. Після 5-ї години дія гормону слабшає і вміст тригліцеридів наближається до вихідного рівня. Що стосується глюкози, то помітна гіпоглікемія спостерігається лише в кінці 5-ї години дії гормону. Кількість фосфоліпідів в умовах досліду практично не змінилась.

4. Активність глутамінсинтетази в гепатопанкреасі та білих м'язах коропа

В умовах голодування риб при температурі 18-20°C одночасно з інтенсивним використанням вільних амінокислот м'язів змінюється активність глутамінсинтетази /ГС/. Утворення глутаміну, як відомо, пов'язано з зневодженням аміаку, оскільки у костяних риб, у тому числі й у коропа, не функціонує цикл сечовиноутворення.

Таблиця 4

Активність ГС в гепатопанкреасі та білих м'язах коропа в умовах голодування при температурі 18-20°C/в мкг Рн на 1 мг білку, $M \pm m$, $n = 5$

Термін голодування	Гепатопанкреас	Білі м'язи	P
12 днів	28,32 ± 3,20	47,71 ± 1,78	< 0,001
20 ---"	25,17 ± 3,21	75,37 ± 2,90	< 0,001
40 ---"	44,00 ± 1,23	38,50 ± 2,78	< 0,2

Як видно з наведених в таблиці 4 даних, через 12 днів перебу-

вання риб в умовах голодування активність ГС в м'язах коропа в 1,6 рази вища, ніж в гепатопанкреасі. Через 20 днів активність ферменту зростає до $75,37 \pm 2,90$ проти $47,71 \pm 1,78$ мкг Рн на 1мг білку. В порівнянні з гепатопанкреасом дія ГС втричі більша. Але через 40 днів картина змінюється. Якщо в м'язах рівень активності ГС зменшився вдвічі у порівнянні з 20-ти деним періодом голодування, то в гепатопанкреасі збільшився в 1,7 рази. Вища активність ГС в м'язах в перші дні голодування коропа обумовлена, скоріше всього, тим, що в даних умовах в першу чергу більш інтенсивно використовуються вільні амінокислоти саме цієї тканини, а потім після досягнення певного рівня їх вмісту відбувається більш інтенсивне використання в гепатопанкреасі.

Окремим дослідженням встановлено, що значний вплив на активність ГС м'язів та гепатопанкреасу здійснює гліцин. При цьому, фермент м'язової тканини менш чутливий до високих концентрацій даної амінокислоти, ніж гепатопанкреасу. Останнє, очевидно, має велике значення при акумулюванні амінокислоти в м'язах в осінній період.

ПРЕТВОРЕННЯ ГЛІЦИНУ В ОРГАНІЗМІ КОРОПА

I. Активність ферментів переамінування гліцину з кетокислотами, а також аланін- і аспаргатамінотрансфераз

При спробі визначити активність ферментів переамінування гліцину з α -кетоглутаратом, оксалоацетатом та піруватом виявилось, що досліджувана амінокислота досить міцно утримує свою аміногрупу і не дезамінується шляхом трансамінування з зазначеними кетокислотами. Літературні дані свідчать про теж саме / Metzler e.a., 1954; Майстер, 1961; Singh, Srivastava, 1963 /. Цей факт вказує на те, що значна кількість гліцину, що накопичується в м'язах коропа, не може бути наслідком інтенсивного його утворення в організмі риб шляхом амінування гліюксидату.

На відміну від досліджуваних вище трансаміназ рівень активності АСТ і АТТ в організмі коропа досить високий. З рисунку 2 видно, що в м'язевій тканині коропа проявляє свою активність лише АСТ, у той час як в гепатопанкреасі діють обидві трансамінази. При цьому у АСТ виявляються два максимума активності - при $\text{pH}=6,5$ і $8,5$. Наявність двох піків аспаргатамінотрансферазної активності в гепатопанкреасі свідчить про те, що АСТ даного органу представлена ізоферментною сис-

темов, яка складається, очевидно, з цитоплазматичної та мітохондріальної аспартатамінотрансфераз.

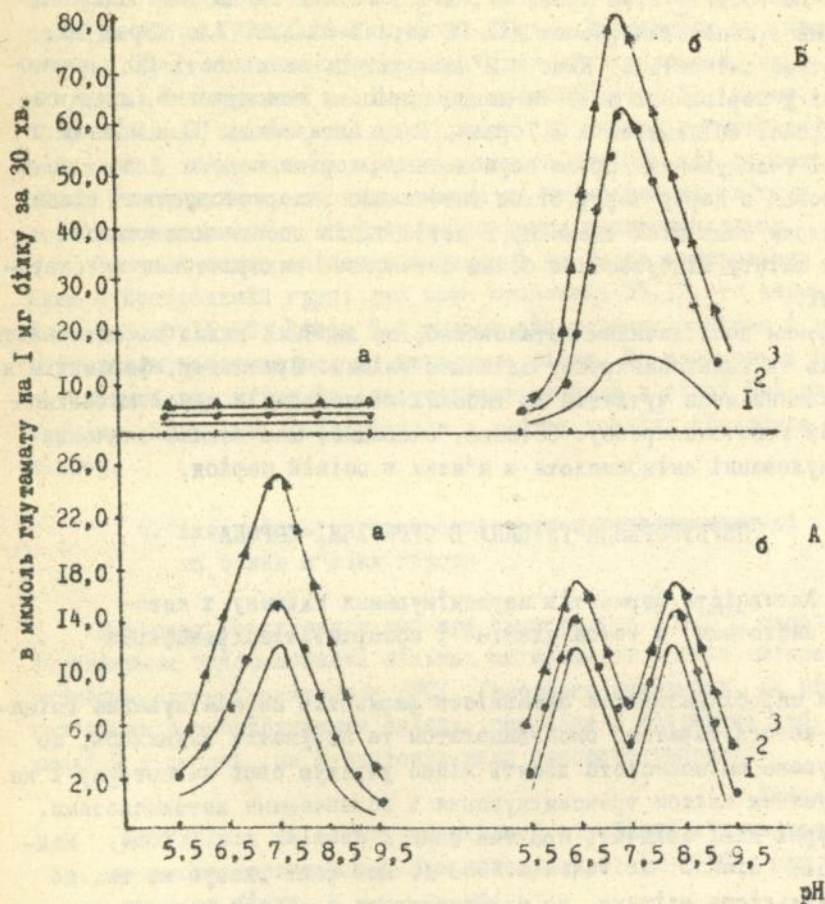


Рис. 2 Активність АСТ /А/ та АЛТ /Б/ в м'язях /а/ і гепатопанкреасі /б/ корона при температурах 0°C/1/, 4°C/2/ 10°C/3/

Сперхані дані свідчать про те, що основна роль в процесах переамінування в м'язях корона належить АСТ, в гепатопанкреасі - АЛТ. Такі особливості спостерігаються і в інших видів риб / Waarde, Kesbeke, 1981 ; Chhatbor, Velan Kar, 1980 /.

2. Активність гліцинооксидази та дезамінувчих НАД- і НАДФ-залежних дегідрогеназ

Експерименти, проведені з гомогенатами досліджуваних тканин коропи, показали, що гліцин позбавляється своєї аміногрупи в них шляхом окислювального дезамінування, перетворюючись при цьому в гліоксильову кислоту. З рисунку 3 видно, що цей процес здійснюється як з

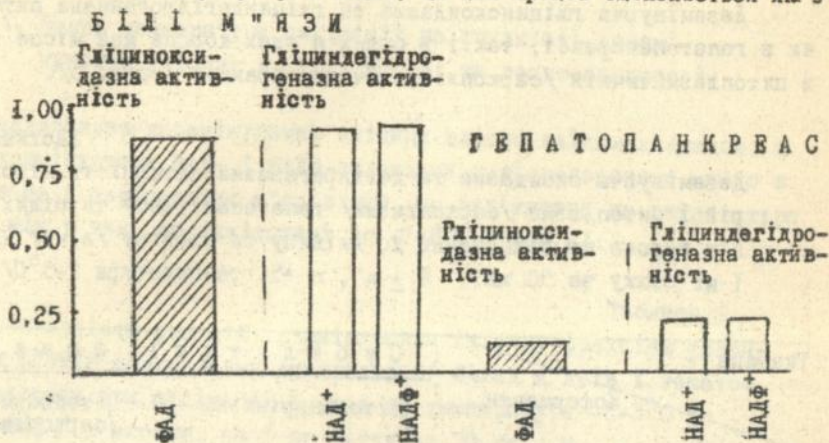


Рис. 3 Гліцинооксидазна та гліциндегідрогеназна активності гомогенатів білих м'язів та гепатопанкреасу коропи / в мкг NH₃ на 1 мг білку за 30 хв., n = 5-8/

участю власної гліцинооксидази, так і дезамінувчими НАД- і НАДФ-залежними дегідрогеназами. Причому, в м'язовій тканині проц. проходить більше інтенсивно, ніж в гепатопанкреасі. Так, окислювальне дезамінування гліцину власне гліцинооксидазою у випадку м'язів відбувається в 5 разів швидше / $0,98 \pm 0,03$ проти $0,19 \pm 0,05$ мкг NH₃ на 1 мг білку за 30 хв/. Інтенсивніше в білих м'язах відбувається окислювальне дезамінування даної амінокислоти і дезамінувчими НАД- і НАДФ-залежними дегідрогеназами. Разом з цим, окислювальне дезамінування гліцину гомогенатами білих м'язів коропи здійснюється з однаковою інтенсивністю як власне гліцинооксидазою, так і з участю дезамінувчих НАД- і НАДФ-залежних дегідрогеназ. В гепатопанкреасі гліцинооксидазна активність достовірно нижча у порівнянні з дезамінувчою дегідрогеназною активністю.

Основна маса інших вільних амінокислот, як і гліцин, з різною

інтенсивність тех перетворється шляхом окислювального дезамінування відповідними оксидазами та дезамінуючими дегідрогеназами. При цьому активність цих ферментів в м'язях вища, ніж в гепатопанкреасі.

3. Локалізація ферментів окислювального дезамінування гліцину та аланіну

Дезамінуюча гліцинооксидазна та гліциндегідрогеназна активність як в гепатопанкреасі, так і в білих м'язях коропа має місце тільки в цитоплазматичній /саркоплазматичній/ фракції /табл. 5/.

Таблиця 5

Дезамінуюча оксидазна та дегідрогеназна активність мітохондрій і цитоплазми /саркоплазми/ гепатопанкреасу та білих м'язів коропа по відношенню до гліцину та аланіну /в мкг NH₃ на 1 мг білку за 30 хв., M ± m, n = 5, температура 2-3°C/

Тканина	: С у б к л і т и н і ф р а к ц і ї		
	Коферменти	:	Мітохондріальна : Цитоплазматична /саркоплазматична/

Г л і ц и н

Білі м'язи

ФАД	0,00	12,36 ± 2,80
НАД	0,00	12,81 ± 1,00
НАДФ	0,00	8,29 ± 0,46

Гепатопанкреас

ФАД	0,00	3,60 ± 0,70
НАД	0,00	2,21 ± 0,18
НАДФ	0,00	2,44 ± 0,25

А л а н і н

Білі м'язи

ФАД	3,03 ± 0,91	7,97 ± 0,71
НАД	1,21 ± 0,40	14,83 ± 0,81
НАДФ	2,30 ± 0,73	8,18 ± 0,85

Гепатопанкреас

ФАД	4,66 ± 1,38	5,51 ± 0,90
НАД	3,39 ± 1,10	4,06 ± 0,63
НАДФ	2,18 ± 0,66	3,14 ± 0,58

Що стосується аланіну, то окислювальне дезамінування останнього відбувається як в мітохондріальній, так і в цитоплазматичній /саркоплазматичній/ фракціях обох тканин. Але активність відповідних ферментів перетворення аланіну в саркоплазмі білих м'язів значно вища, ніж в мітохондріях. В гепатопанкреасі такої різниці не спостерігається. Очевидно, ферменти окислювального дезамінування інших амінокислот локалізовані так само, як і у випадку з аланіном.

4. Вплив температури аклімації на швидкість дезамінування гліцину в білих м'язах та гепатопанкреасі

Окислювальне дезамінування гліцину власне гліцинооксидазов, а також дезамінуючими НАД- і НАДФ-залежними дегідрогеназами майже в 3 рази вище в саркоплазмі м'язів риб, що аклімовані до температури $-2-3^{\circ}\text{C}$, ніж у тых, що аклімовані до $+7+8^{\circ}\text{C}$ /табл.6/.

Таблиця 6

Інтенсивність реакцій дезамінування гліцину фракціями розчинних білків саркоплазми /цитоплазми/ білих м'язів і гепатопанкреасу при аклімації коропи до температури $-2-3^{\circ}\text{C}$ та $+7+8^{\circ}\text{C}$ / в мкг NH_3 на 1 мг білку за 30 хв., $\text{M} \pm \text{m. n} = 5/$

Тип коферменту	Температура аклімації		P
	$-2-3^{\circ}\text{C}$	$+7+8^{\circ}\text{C}$	
	Б І Л І М " Я З И		
ФАД	$12,36 \pm 2,60$	$4;00 \pm 0,93$	$< 0,05$
НАД	$12,81 \pm 1,00$	$4,14 \pm 0,19$	$< 0,001$
НАДФ	$8,29 \pm 0,46$	$4,97 \pm 0,42$	$< 0,01$
	Г Е П А Т О П А Н К Р В А С		
ФАД	$3,60 \pm 0,70$	$2,40 \pm 0,46$	$> 0,1$
НАД	$2,21 \pm 0,18$	$1,75 \pm 0,41$	$> 0,2$
НАДФ	$2,44 \pm 0,25$	$2,04 \pm 0,21$	$> 0,2$

Що стосується гепатопанкреасу, то температура аклімації риб в межах $-2-3^{\circ}\text{C}$ до $+7+8^{\circ}\text{C}$ суттєво не впливає на швидкість окислювального дезамінування гліцину, як це має місце: в білих м'язах.

Для багатьох видів риb з підвищенням температури пропорційно знижується в м'язях активність більшості гліколітичних ферментів / Hochachka, Somero, 1973 /, трансаміназ / McCorkle, 1979; Lehmann, 1970a; Lehmann, 1976b /, цитоплазматичної АСТ / Mayerle, Bitter, 1971 /, і АЛТ / Mester, Iordacheacu, 1972 /.

Таким чином, цей та попередні досліді показувть, що процес окислявального дезамінування гліцину та інших амінокислот більш інтенсивно відбувається в білих м'язях корона. Останнє свідчить про важливу роль м'язів не тільки в акумулюванні амінокислот, але й в безпосередньому їх перетворенні.

ПЕРЕТВОРЕННЯ ГЛІОКСИЛАТУ В ОРГАНІЗМІ КОРОПА

I. Реакції конденсації гліоксидату з кетокислотами

При використанні нативного екстракту білих м'язів /рис. 4А/

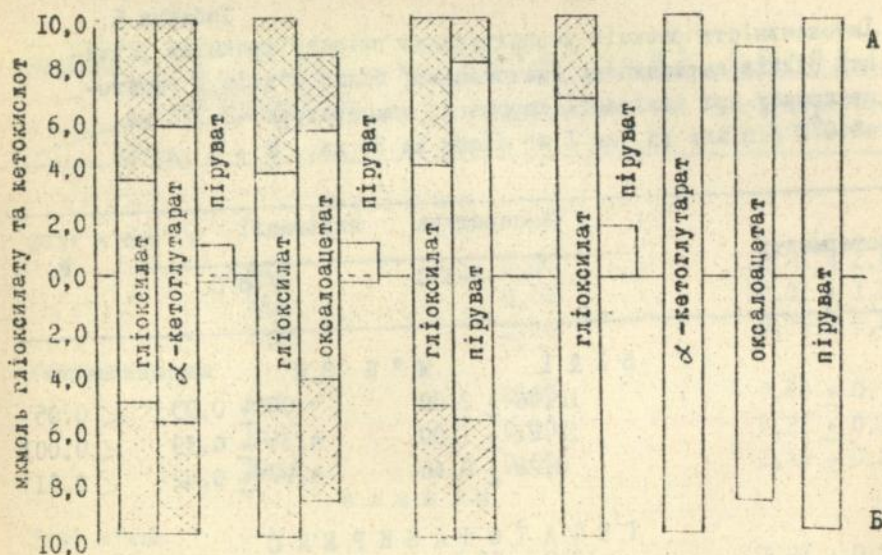


Рис. 4 Використання гліоксидату та кетокислот в ферментативній /А/ і неферментативній /Б/ реакціях в присутності екстракту білих м'язів /в мкмоль на 1 мг білку, рН=7,4, температура 18°C, n=5. Час інкубації 60 хв. -використалось в реакції, - залишилось після реакції/

спостерігається зменшення кількості гліюксилату при інкубації його з кожною з використаних кетокислот. В системі гліюксилат+ α -кетоглутарат, гліюксилат+оксалоацетат і гліюксилат+піруват гліюксилової кислоти використалось відповідно 5,91; 5,92 та 5,62 мкмоль. За цей час α -кетоглутарату та оксалоацетату вступило в реакції 3,35 і 3,58 мкмоль, тобто менша і не еквівалентна гліюксилату кількість. При цьому, в інкубаційному середовищі з'являється піруват. Зменшення кількості кетокислот, використаних окремо за час інкубації, не спостерігається.

Дослідження, проведені з інактивованими екстрактами білих м'язів /рис. 4Б/, теж показали зменшення кількості гліюксилату після реакції в присутності відповідних кетокислот. Біла 50% його використовується в реакціях. В цих умовах в дуже незначній кількості виявляється піруват. При роботі з інактивованими екстрактами не відбувається зміни кількості гліюксилату, взятого окремо.

Аналогічна картина спостерігається і при роботі з нативними та інактивованими екстрактами гепатопанкреасу. Але в даному випадку гліюксилату в реакціях використовується в 1,2 рази більше. Значно більше, ніж у випадку білих м'язів утворюється пірувату.

Зваживши на те, що в кожному з трьох випадків гліюксилату використовується більше, ніж кетокислот, можна зробити висновок про те, що поряд з основною реакцією конденсації, гліюксилат з допомогою ферментної системи досліджуваних тканин підлягає й іншому перетворенню. Продуктом цього перетворення є піруват. Експеримент також показує, що конденсація гліюксилату з кетокислотами можлива і в наферментативних умовах.

Заслуговує на увагу зменшення кількості гліюксилату, використаного окремо без кетокислот з допомогою ферментних систем білих м'язів та гепатопанкреасу.

2. Гліюксилаткарболігазне перетворення гліюксилової кислоти в гепатопанкреасі та м'язах кролика

Експеримент, проведений з "грубими" /не діалізованими/екстрактами м'язів та гепатопанкреасу, показав /рис.5/, що відновлений НАД дуже швидко окислюється в присутності гліюксилату як при добавлянні ТДФ та катіонів магнію, тобто повною сумішю, так і без них /в,г,д/. Швидкість окислення НАДН⁺ екстрактом з гепатопанкреасу вища, у порівнянні з м'язовою тканиною. В першому випадку реакція завершується прак-

тично повністю через 1,5 хв., в другому - через 3 хв. при майже однаковій кількості біяку в пробах /у випадку гепатопанкреасу - 6,3 мг. м'язів - 5,7 мг/. Використання окисленого НАД показало, що він

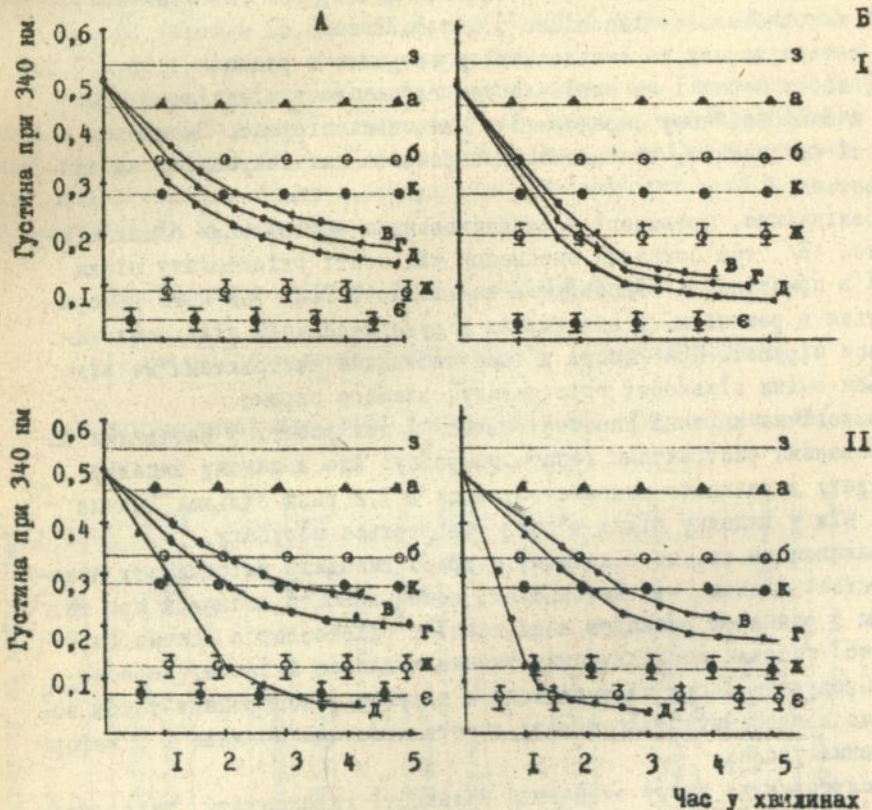


Рис. 5 Зміна оптичної густини розчинів при використанні "грубих" /I/ та діалізованих /II/ екстрактів білих м'язів /А/ та гепатопанкреасу /Б/ коропа при pH=7,0

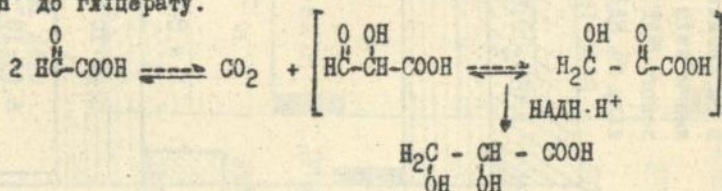
а. Пф, катіони магнію, відсутній гліоксилат; б. присутній тільки гліоксилат; в. гліоксилат, катіони магнію, відсутній Пф; г. гліоксилат, Пф, катіони магнію відсутні; д. повна інкубаційна суміш; е. гліоксилат, катіони магнію та НАД окислений; ж. гліколат та НАД окислений; з. гліоксилат, катіони магнію, Пф і відновлений НАД; к. глікольальдегід та НАД відновлений

не відновлюється ферментною системою в присутності гліюксилату ні екстрактом з гепатопанкреасу, ні м'язів /є/. Такий же ефект спостерігається у випадку використання в якості субстрату гліюклату /ж/. Не виявлено також окислення відновленого НАД і при використанні гліюкоальдегіду /к/. Не спостерігається зміна оптичної густини інкубаційного середовища при використанні відновленого НАДФ /з/.

Подібна картина спостерігається і у випадку використання частково діалізованих екстрактів досліджуваних тканин. Але окислення відновленого НАД більш інтенсивно спостерігається при наявності в інкубаційному середовищі ТПФ та катіонів магнію /д/.

Таким чином, в гепатопанкреасі і м'язах коропа відбувається залежне від тиамінпірофосфату перетворення гліюксилової кислоти. В гепатопанкреасі цей процес здійснюється майже в два рази швидше.

Враховуючи дані рисунку 5 /I/ та 5 /II/, можна сказати, що гліюксилат перетворюється в гліюксилаткарболігазній реакції через семиальдегід тартронової кислоти /або його ізомер оксипіруват/ - продукт конденсації однієї молекули гліюксилату з одновуглецевим фрагментом, що утворюється внаслідок реакції декарбокисливання другої. Саме цей продукт з допомогою гліюксилаткарболігази відновлюється з участю НАДН·Н⁺ до гліцерату.



Подібне перетворення гліюксилату відбувається у деяких організмів / Callaly, Dagley, 1959 ; Kornberg, Gotta, 1959 ; Hall, Vennealand, Kendy, 1969 ; Badour, Waygood, 1971 ; Kelner, 1989 /.

Гліюксилаткарболігазна активність у вищезгаданих випадках проявляється в організмів, вирощених на середовищі з гліцином, гліюклатом або адаптованих до гліюклату. Ці факти свідчать про те, що гліцин та гліюклат є індукторами утворення гліюксилаткарболігази - ферменту, з участю якого відбувається подальше перетворення гліюксилату, утвореного з гліцину або гліюклату. В цьому плані у коропа ситуація аналогічна - в його м'язах в осінній період накопичується значна кількість вільного гліцину.

Активність ЛДГ, МДГ, СДГ та іЩДГ в гепатопанкреасі та білих м'язях коропи

Рисунок 6 відображає рівень активності ЛДГ, МДГ, СДГ та іЩДГ в білих м'язях коропи. В саркоплазмі м'язів переважає активність ЛДГ. Вона в 1,6 рази більша, ніж МДГ. В порівнянні з іЩДГ дія ЛДГ значно висока. Окислення відновленого НАД лактатдегідрогеназов здійснюється в 221 раз швидше, ніж відновлення НАДФ ізоцитратдегідрогеназов.

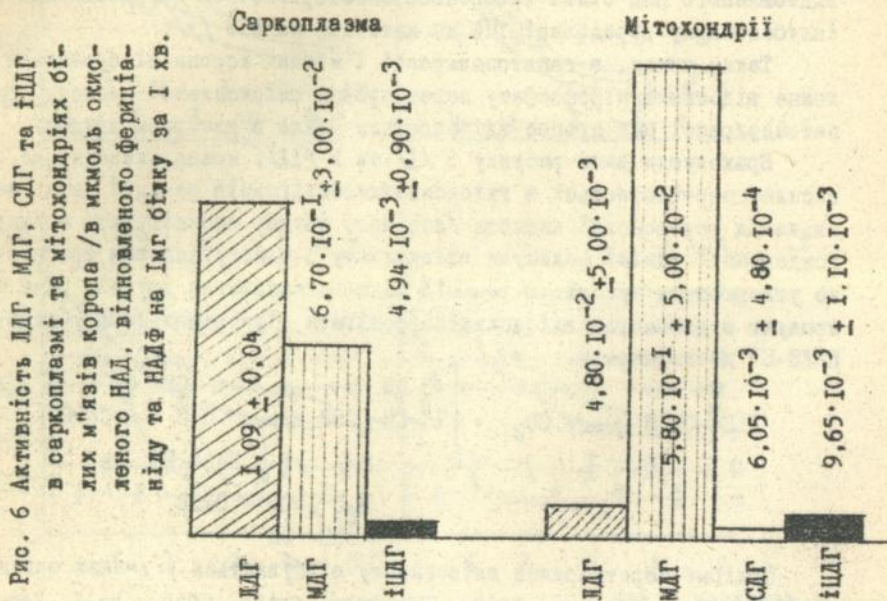


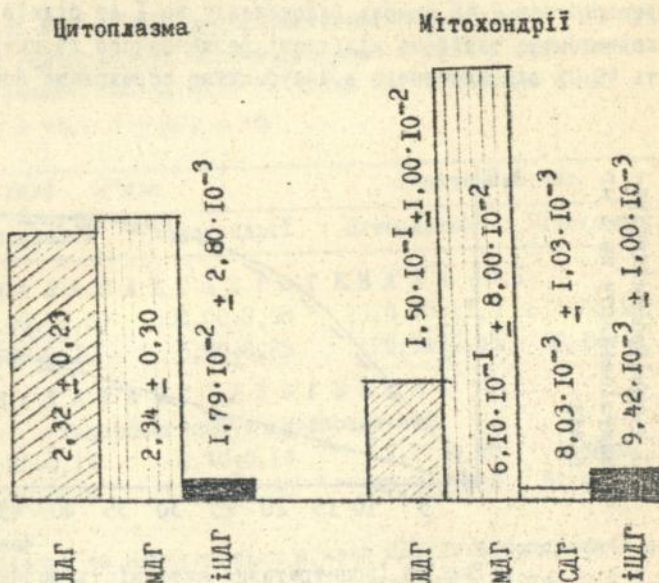
Рис. 6 Активність ЛДГ, МДГ, СДГ та іЩДГ в саркоплазмі та мітохондріях білих м'язів коропи /в мкмоль окисленого НАД, відновленого ферменту та НАДФ на 1 мг білку за 1 хв.

В мітохондріях картина інша. Тут переважає активність МДГ / $5,80 \cdot 10^{-1} \pm 5,00 \cdot 10^{-2}$ мкмоль окисленого НАД на 1 мг білку за 1 хв. інкубації/. Що стосується ізоцитратдегідрогенази, то її активність в 2 рази вища, ніж в саркоплазмі, але значно слабша в порівнянні з МДГ та ЛДГ даної фракції. Внаслідок цього, окислення ізоцитрату тут відбувається в 60 разів повільніше /всього $9,65 \cdot 10^{-3} \pm 1,10 \cdot 10^{-3}$ мкмоль відновленого НАДФ на 1 мг білку за 1 хв./, ніж окислення малату, та майже в 5 разів, ніж лактату. Дуже повільно в мітохондріях м'язів відбувається окислення сукцинату. Активність СДГ майже на два поряд-

ки нижча в порівнянні з МДГ та на порядок - з ІДГ.

В гепатопанкреасі /рис.7/. на відміну від білих м'язів, окислення малату та лактату в цитоплазмі здійснюється практично з однаковою швидкістю. Рівень активності ІЩДГ, як і в м'язах дуже низький. Швидкість окислення ізоцитрату в цитоплазмі гепатопанкреасу відбувається в 1307 разів повільніше, ніж малату та лактату.

Рис. 7 Активність ЛДГ, МДГ, СДГ та ІЩДГ в цитоплазмі та мітохондріях гепатопанкреасу коропа /в імкнох окисленого НАД, відновленого ферментів іду та НАДФ на Імг білку за 1 хв.



В мітохондріях гепатопанкреасу коропа загальна картина аналогічна тій, що має місце в такій же фракції м'язів.

Факти дуже низької активності СДГ мають місце і у інших видів риб. До того ж, в умовах голодування активність даного ферменту зменшується на 44,4% / Malhotra, Sharma, 1987; Vijayaraghavan, Rao, 1985 /. У 28 видів СДГ виявляється тільки в переднерестовому та нерестовому періодах / Шелкін, 1978; Шелкін, Емеретлі, 1986 /. Що стосується МДГ, то активність її в мітохондріях печінки та м'язів багатьох видів риб теж набагато вища, ніж СДГ /Deu, 1984; Mollnes et al., 1985; Sian, Ip, 1987; Емеретлі, 1987/.

Ізоцитратазна активність гепатопанкреасу і білих м'язів

Розчина фракція білків цитоплазми /саркоплазми/ гепатопанкреасу і білих м'язів проявляє ізоцитратазну активність /рис. 8/. Швидкість розщеплення ізоцитрату /I/, а також цитрату /I"/ в саркоплазмі м'язів лінійно наростає протягом години. В гепатопанкреасі, на відміну від м'язів, цей процес відбувається протягом 30 хв. За цей час утвориться 2,42 мкмоль гліоксилату на 1 мг білків цитоплазми. Це еквівалентно такій же кількості розщепленого ізоцитрату, що становить 49,0% від внесеного в інкубаційне середовище його кількості.

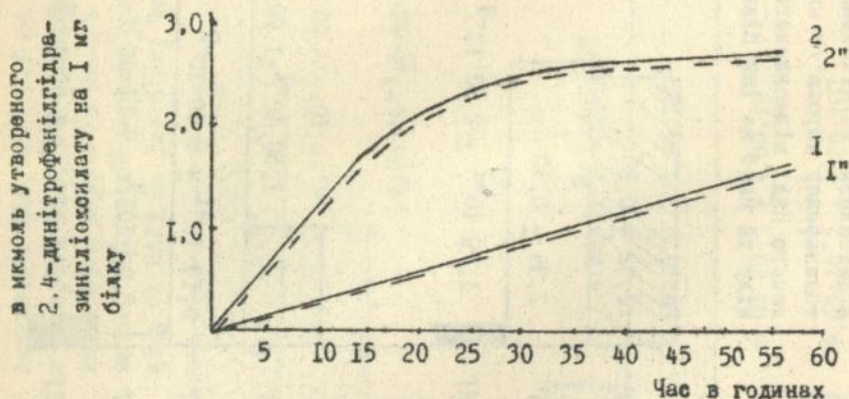


Рис. 8 Ізоцитратазна активність розчинних білків саркоплазми м'язів /I/ та цитоплазми гепатопанкреасу /2/. Субстрат - ізоцитрат. /I" та 2" - цитрат/, n = 5

Що стосується білих м'язів, то з участю розчинних білків аналогічної фракції, ізоцитрату зменшлось лише на 0,66 мкмоль, що становить 13,2%. Тобто, за 30 хв., коли з участю розчинних білків цитоплазми гепатопанкреасу по суті наступає рівновага в ізоцитратазній реакції, розщепляється в 2,6 рази більше ізоцитрату, ніж в аналогічних умовах в білих м'язах. Наявність ізоцитратазної активності в досліджуваних тканинах коропа свідчить про функціонування в них видозміненого трикарбонного циклу - гліоксилатного.

"Малик"-ензиматична активність в гепатопанкреасі та білих м'язах коропа

В досліджуваних тканинах риб перетворення малату відбувається також з участю МДГ [декарбоксиввчої оксалоацетат], відомого як "малик", або яблучний фермент.

Таблиця 7

Активність МДГ та МДГ [декарбоксиввчої оксалоацетат] в саркоплазмі /цитоплазмі/ та мітохондріях м'язів і гепатопанкреасу з участю НАД та НАДФ /в ммоль НАД і НАДФ на 1 мг білку за 1 хв., М ± m; n = 8/

Вид ко-ферменту	Білі м'язи	Гепатопанкреас		
	Саркоплазма	Мітохондрії		
	Мітохондрії	Цитоплазма		
	Мітохондрії	Мітохондрії		
МАЛАТ ДВГІДРОГЕНАЗА				
НАД	670,00±11,00	580,00±9,58	2320,00±47,9	610,00±10,30
НАДФ	2,00±0,10	5,40±0,25	20,56±0,45	36,14±0,38
МАЛАТ ДВГІДРОГЕНАЗА [декарбоксиввча оксалоацетат]				
НАД	0,80±0,15	0,70±0,10	1,77±0,20	1,88±0,25
НАДФ	17,40±0,95	4,75±0,50	87,21±1,00	51,42±0,95

В саркоплазмі та мітохондріях м'язів МДГ [декарбоксиввча оксалоацетат] - є НАДФ-залежним ферментом. Аналогічна ситуація і в гепатопанкреасі. Активність НАДФ-"малик" ферменту в цитоплазматичній /саркоплазматичній/ фракції обох тканин вища, ніж в мітохондріальній. При цьому, перетворення малату безпосередньо в піруват відбувається в цитоплазмі гепатопанкреасу в 5 разів, а в мітохондріях майже в 10 разів швидше, ніж в таких же фракціях м'язів.

Активність "яблучного" ферменту, виділеного з цитоплазми та мітохондрій гепатопанкреасу і очищеного майже в 200 разів, значно міров залежить як від рН середовища, так і від концентрації субстрату. При низькій концентрації малату /0,1 ммоль/ максимальна активність даного ферменту спостерігається при рН=7,0 /рис. 9/. Підвищення кількості малату до 1,0 ммоль викликає помітне притягання дії ферменту при даному значенні рН. Більш значний інгібувальний ефект дос-

ліджуваного ферменту при $pH=7,0$ спостерігається при концентрації малату $10,0$ ммоль. В той же час, підвищення pH середовища знімає інгібувальний ефект більш високих, ніж $0,1$ ммоль концентрацій малату.

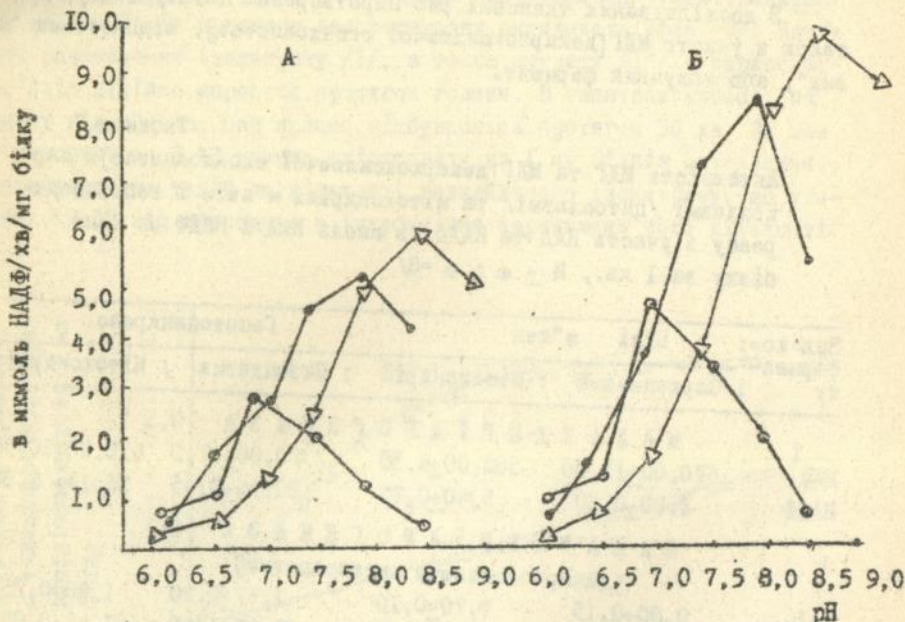


Рис. 9 Вплив pH та концентрації малату на інтенсивність окислювального декарбоксилювання останнього мітохондріального /А/ та цитоплазматичним /Б/ НАДФ-"малик" ензимом /о—о— 0,1 ммоль; ●—●— 1,0 ммоль; ▲—▲— 10,0 ммоль малату/

Максимальна активність НАДФ-"малик" ензиму при концентрації малату $1,0$ ммоль спостерігається при $pH=8,0$, а при $10,0$ ммоль — при $8,5$. При $pH=9,0$ активність ферменту помітно зменшується, хоча це досить висока в порівнянні з попередніми значеннями pH . Таким чином, в організмі коропа можливе модульоване регулювання активності НАДФ-"малик" ферменту.

Слід зазначити, що МДГ та МДГ [декарбоксиливіча оксалоацетат] по рівні своєї активності набагато перевищують активність таких окислювальних ферментів ЦТК як ІЦДГ та СДГ. Це свідчить про слабе функціонування даного циклу. Цілковито можливо, що синтез енергії в організмі коропа відбувається завдяки дії простішого, але досить ефек-

тивного, циклу дикарбонових кислот. "Паливом" для такого циклу, як відомо, служить гліюксилат. Останній, конденсується з ацетил-КоА утворює малат.

3. Активність малат- та цитратсинтетаз в гепатопанкреасі та білих м'язях коропа

Виділена та очищена з мітохондрій гепатопанкреасу та м'язів білкова фракція каталізує синтез малату та цитрату /рис.10/. Утворення малату в обох тканинах відбувається майже в два рази повільніше, ніж цитрату /крива 3/. За 3 хв. інкубації в мітохондріях гепатопанкреасу на синтез останнього використовується біля 22% ацетил-КоА, на синтез малату - 11,5%. Через 5 хв. відповідно 30 та 14,8%.

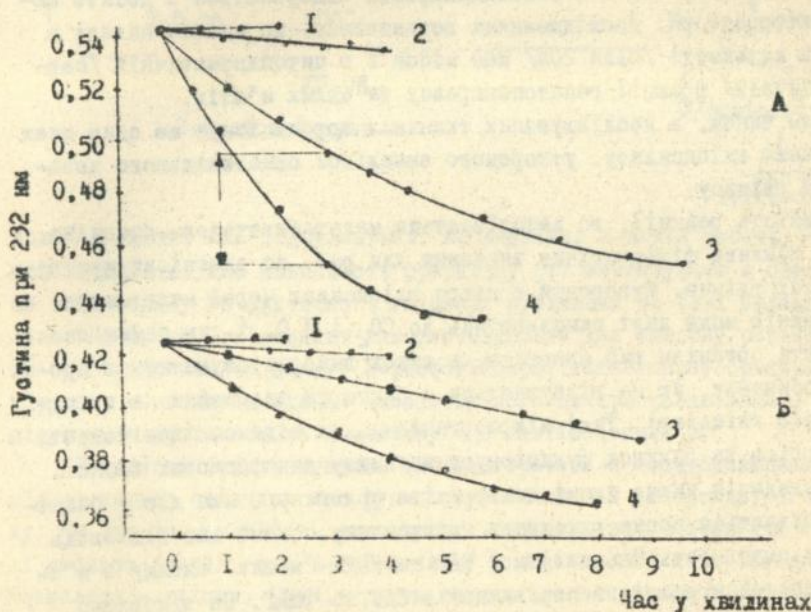


Рис.10 Використання ацетил-КоА при утворенні малату /3/ та цитрату /4/ в присутності гліюксилату та оксалоацетату в мітохондріальній фракції гепатопанкреасу /А/ і білих м'язів /Б/ коропа. 1 - відсутність ферментного препарату; 2 - без ацетил-КоА; 3,4 - в присутності 0,02 мг ферментного препарату; рН=7,6

В мітохондріях м"язів синтез цитрату і малату здійснюється повільніше. При такій же кількості ферменту в середовищі за 3 хв. на синтез цитрату використовується всього 8,64%, а на синтез малату тільки 3,7% ацетил-КоА. Через 5 хв. відповідно II, I та 6,17%.

Слід звернути увагу на те, що синтез цитрату мітохондріальною цитратсинтетазою гепатопанкреасу через 5 хв. інкубації практично завершується, в той час як синтез малату продовжується. На десяту хвилину ацетил-КоА використовується вже 21%. В білих м"язах біосинтез цитрату і малату продовжується більше 10 хв.

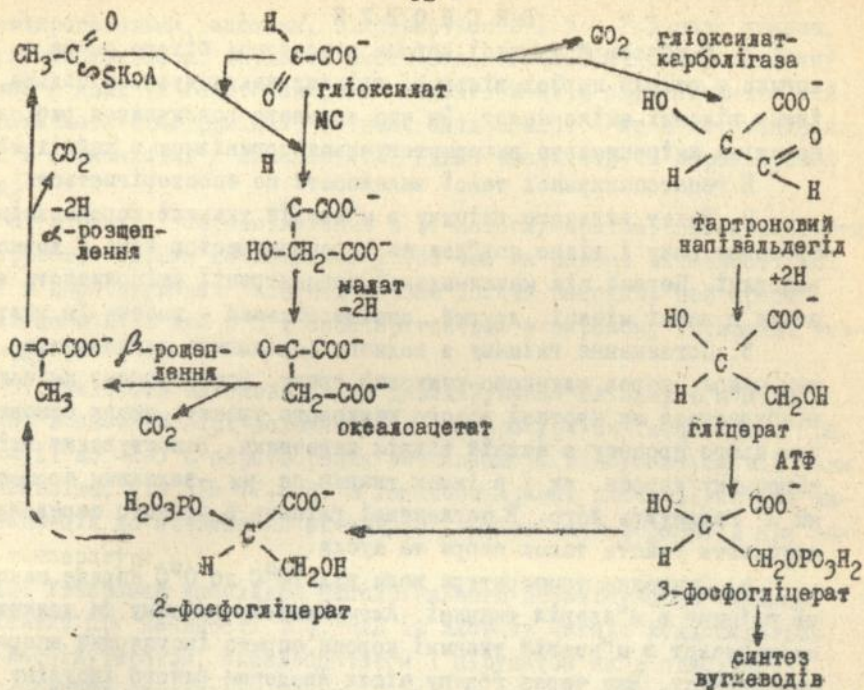
Окремі дослідження показали, що малатсинтетаза мітохондрій гепатопанкреасу має два чітко виражених піка ферментативної активності. Один з них більший, при $\text{pH}=7,3$, другий - менший, при $\text{pH}=8,0$. Малатсинтетаза мітохондрій м"язів максимально активна тільки при $\text{pH}=7,2$. Взагалі ж синтез малату, і таким чином використання глікоцилату /гліцину/ як в м"язах, так і в гепатопанкреасі відбувається в досить широкому інтервалі pH . Дослідженнями встановлено, що синтез малату в незначній кількості /біля 20%/ має місце і в цитоплазматичній /саркоплазматичній/ фракції гепатопанкреасу та білих м"язів.

Таким чином, в досліджуваних тканинах коропа існує ще один шлях використання глікоцилату, утвореного внаслідок окислювального дезамінування гліцину.

Наявність реакції, що каталізується малатсинтетазою, очевидно, має дуже важливе фізіологічне значення для риб, що здатні акумулювати в м"язах гліцин. Утворений з нього глікоцилат через малатсинтетазу реакцій може далі окислюватись до CO_2 і H_2O , і тим самим забезпечувати організм риб енергією, а також використовуватись в процесах біосинтезу, як це відбувається у бактерій вирощених на глікоцилаті, або гліколаті. Такі мікроорганізми, як відомо, забезпечують себе енергією за рахунок функціонування циклу дикарбонових кислот.

В наведеній нижче схемі циклу /ліва половина/, яка діє у бактерій, відбувається повне окислення глікоцилату. Схема дає відповідь на значну активність НАД-залежної МДГ та НАДФ-"малик" ензиму в м"язах та гепатопанкреасі, в порівнянні з СМГ та іЦДГ. Це зумовлено утворенням певної кількості малату в реакції конденсації глікоцилату з ацетил-КоА. З участю МДГ та МДГ [декарбоксилюючої оксалоацетат] малат підлягає перетворенню або до оксалоацетату, або безпосередньо до пірувату.

Перетворення, що показані в правій половині схеми теж необхідні організму риб. По-перше, глікоцилаткарболігазне перетворення гліокси-



лової кислоти; яке відбувається, як виявлено в даній роботі, з великою швидкістю, дає можливість організму риб синтезувати з одного лише глікоксилату /а фактично з гліцину/ вуглеводи та інші складні сполуки. По-друге, глікоксилат використовується для синтезу регенерувачого субстрату самого циклу. 2-фосфогліцерат легко перетворюється в піруват, а останній шляхом окислювального декарбоксілювання з участю піруватдегідрогеназного комплексу - в ацетилкоензим А.

Наявність малатдегідрогенази та ізоцитратази в гепатопанкреасі та м'язах коропа свідчить про функціонування в них глікоксилатного циклу. Це дає їм можливість синтезувати глюкозу, використовувачи як жирні кислоти /жири/, так і глікоксилат, а в дійсності найпростішу амінокислоту - гліцин. Саме жири та гліцин накопичуються в організмі, і перш за все в м'язевій тканині коропа перед зимівлею. Завдяки МС та іншим ферментам глікоксилатного циклу ці метаболіти можуть бути використані у весняний період для синтезу глюкози. Остання необхідна для оптимальної діяльності нервової системи та м'язів у даний період.

Б И С Н О В К И

1. В м'язевій тканині коропа лускатого, білого амура та товсто-лобика в осінній період вільного гліцину накопичується більше, ніж інших вільних амінокислот. За час зимового голодування риби ця найпростіша амінокислота використовується організмом в найбільшій мірі.

В гепатопанкреасі такої залежності не спостерігається.

2. Вміст вільного гліцину в м'язевій тканині коропа змінюється протягом року і тісно пов'язаний з концентрацією його у водному середовищі. Перший пік максимальної концентрації амінокислоти з'являється в липні місяці, другий, значно більший - восени /в жовтні/.

3. Поглинання гліцину з водного середовища здійснюється, головним чином, через шлунково-кишковий тракт. Всмоктування амінокислоти відбувається на протязі всього кишкового тракту, однак основним місцем цього процесу є задній відділ кишечника. Всмоктування гліцину в кишечнику коропа, як і в інших тварин, є на-залежним процесом. Іони K^+ гальмують його. В поглинанні гліцину з водного середовища приймають участь також зябра та луска.

4. Зниження температури води від $18^{\circ}C$ до $0^{\circ}C$ сприяє накопиченню гліцину в м'язевій тканині. Акумулявання гліцину та деяких інших амінокислот в м'язевій тканині коропа сприяє інсулярний апарат гепатопанкреасу. Вже через годину після введення бичого інсуліну відбувається збільшення кількості гліцину в м'язах. Подібна дія гормону продовжується протягом 5 годин. У порівнянні з гліцином і іншими вільними амінокислотами вплив бичого інсуліну на динаміку глікози дуже повільний.

5. В період зимового голодування коропа в м'язах та гепатопанкреасі підвищується активність глутамінсинтетазы, дія якої призводить до знешкодження аміаку. Значний вплив на активність даного ферменту здійснює концентрація гліцину, який є одним з регуляторів активності цього ферменту.

6. Перетворення гліцину в організмі коропа здійснюється шляхом окислювального дезамінування як власне гліциноксидазов, так і дезамінуючими НАД- і НАДФ-залежними дегідрогеназами. Продуктом цих перетворень є гліоксидова кислота. Окислювальне дезамінування гліцину в білих м'язах коропа відбувається в значно більшій мірі, ніж в гепатопанкреасі. Подібне перетворення гліцину власне гліциноксидазов здійснюється навіть в присутності вітаміну B_2 як компоненту ФМН і ФАД.

7. В гепатопанкреасі перетворення гліцину НАД- і НАДФ-залежні-

ми дегідрогеназами, навпаки, відбувається в 1,5 - 2,5 рази швидше, ніж гліцинооксидазюв. ферменти окислювального дезамінування гліцину в білих м'язях та гепатопанкреасі локалізовані в саркоплазматичній /цитоплазматичній/ фракції, а інших амінокислот - як в мітохондріях, так і в саркоплазмі /цитоплазмі/, однак швидкість їх перетворення різна.

8. В реакції перерамінування з α -кетоглутаратом, оксалоацетатом та піруватом гліцин не вступає, у той час як рівень активності АСТ і АЛТ в досліджуваних тканинах коропа досить високий. Цей процес має місце навіть при 0°C і спостерігається в широкому інтервалі значень рН.

9. Швидкість окислювального дезамінування гліцину в м'язевій тканині в значній мірі залежить від температури акліматії риби. При акліматії до -2-3°C перетворення амінокислоти відбувається в 3 рази інтенсивніше, ніж при +7+8°C. В гепатопанкреасі спостерігається лише тенденція до підвищення активності відповідних ферментів при зниженні температури.

10. Утворення внаслідок окислювального дезамінування гліцину гліюксилат при наявності ППФ, НАД та хлориду магнію конденсується з α -кетоглутаратом, оксалоацетатом і піруватом як в присутності інактивованих екстрактів тканини, тобто в неферментативній реакції, так і з участю нативного ферменту. В останньому випадку в інкубаційному середовищі утворюється піруват.

11. Гліюксилова кислота дуже швидко перетворюється в гліюксилат-карбодігезній реакції з утворенням семиальдегіду тартронової кислоти /або його ізомеру оксипірувату/. Частково діалізовані екстракти гепатопанкреасу перетворюють гліюксилат з допомогою гліюксилатної карбодігези через 1,5 хв, екстракти білих м'язів - вдвічі повільніше. Фермент стійкий до інактивації, зберігає свою активність в замороженому стані більше двох місяців в інтервалі рН від 6,0 до 9,0.

12. В саркоплазматичній фракції білих м'язів коропа окислення лактату відбувається в 1,5 рази швидше, ніж малату і в 221 раз інтенсивніше у порівнянні з ізоцитратом, що свідчить про високу активність МДГ в цій фракції. В мітохондріях, навпаки, вище активність МДГ.

13. Окислення малату в досліджуваних тканинах коропа відбувається також і з участю "яблучного" ферменту, що приводить до утворення пірувату. "Яблучний", або "малик"-фермент специфічний по відношенню до НАДФ, і таким чином є НАДФ-залежним. Фермент присутній як в сар-

коплазматичній /цитоплазматичній/, так і в мітохондріальній фракціях.

14. Малат в досліджуваних тканинах коропа більш інтенсивно / в середньому в 5 разів / підлягає окислювальному декарбоксилюванню, ніж окислення ізоцитрату НАДФ-залежною ізоцитратдегідрогеназою. Цей процес має місце, головним чином, в саркоплазмі білих м'язів. НАДФ-ізоцитратдегідрогеназа у порівнянні з НАДФ-"малик" ензимом, навпаки, активніша в мітохондріях.

15. Активність НАДФ-залежного "малик" ензиму залежить від концентрації малату, яка в свою чергу зв'язана з рН середовища. Високі концентрації малату гальмують активність ферменту. Однотипний інгібуєчий ефект високих концентрацій субстрату знімається підвищенням рН, і таким чином відбувається модульоване регулювання активності мітохондріального та цитоплазматичного "яблучного" ферменту.

16. Висока ізоцитратазна активність в білих м'язах та гепатопанкреасі свідчить про функціонування в цих тканинах глікоксилатного циклу, що дає можливість організму риб синтезувати з жирів вуглеводи і, навпаки, з вуглеводів жири, а також мати додатковий шлях для утворення трикарбонових кислот і далі α -кетоглутарату з глікоксилату.

17. Значна частина глікоксилату в досліджуваних тканинах коропа використовується в малатсинтезній реакції. Малатсинтеза по рівню своєї активності приблизно в 2 рази менш активна, ніж цитратсинтеза. Біля 80% активності даного ферменту зосереджена в мітохондріях і 20% - в цитоплазмі/саркоплазмі/. Синтез малату, і таким чином використання глікоксилату/гліцину/ відбувається в широкому інтервалі рН.

18. Наявність малатсинтези, а також НАД-залежної малатдегідрогенази та НАДФ-"малик" ензиму, дія яких приводить до утворення відповідно оксалосукцату та безпосередньо пірувату, свідчить про функціонування в досліджуваних тканинах коропа циклу дикарбонових кислот. Останній відіграє вирішальну роль в забезпеченні організму риб енергією в умовах зимового, і особливо весняного голодування.

19. М'язева тканина коропових риб виконує дуже важливу фізіологічну роль. Поряд з скорочувальною функцією, вона здатна акумулювати вільні амінокислоти, і перш за все гліцин, який разом з жирами є важливим енергоносієм. Безпосередньо в м'язах відбувається перетворення самих амінокислот. Активність окремих ферментів перетворення цих субстратів в м'язах, і особливо гліцину вища, ніж в гепатопанкреасі. Висока активність глутамінсинтези в м'язах у порівнянні з гепатопанкреасом свідчить про участь даної тканини в утворенні екскреторного азоту в організмі коропа.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

З метов підвищення оплати корму при вирощуванні коропових риб в умовах штучного розведення, при підготовці риб до зимового голодування, і особливо у весняний період після закінчення зимівлі рекомендується застосовувати добавки до раціону гліцину, як харчового стимулятора та як джерело енергії.

Добавки гліцину в кількості 500 мкмоль/л можуть мати вирішальне значення у виживанні молоді коропових риб.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Сравнительная характеристика отдельных биохимических показателей в тканях теплокровных и холоднокровных животных /Крутовский С.В., Яковенко Б.В., Курант В.З. и др.//ІУ Всесовзн.биохим.с"езд: Тез. научн.сообщ. - Москва, 1979. - т. 2. - С.157.
2. Яковенко А.Ф., Курант В.З., Яковенко Б.В. Содержание нуклеиновых кислот и белка в некоторых тканях карпа //Гидробиол. журн. - 1980. - т.ХVI, вып. 6. - С. 48-52.
3. Яковенко Б.В., Курант В.З., Яковенко А.Ф. Влияние температуры и pH среды на активность некоторых аминотрансфераз в тканях карпа // Гидробиол. журн. - 1981. - т.ХVI, вып. 2. - С. 69-72.
4. Курант В.З., Яковенко Б.В., Яковенко А.Ф. Содержание белка и нуклеиновых кислот в некоторых тканях карпа, белого амура и толстолобика // Гидробиол.журн. - 1981. - т.ХVII, вып. 5. - С. 118-119.
5. Яковенко Б.В., Курант В.З., Яковенко А.Ф. Влияние голодания на белковый обмен в мышечной ткани карповых рыб // Гидробиол. журн. - 1982. - т.ХVIII, вып. 5. - С. 100-105.
6. Яковенко Б.В., Курант В.З., Яковенко О.Ф. Вміст і шляхи можливого використання гліцину у коропових риб // ІУ Укр. біохім. з"їзд: Тез. доп. - Київ, 1982. - ч. I. - С. 157.
7. К методике определения общего количества липидов в тканях карпа / Крутовский С.В., Яковенко Б.В., Шандрук Р.Н. и др. // Гидробиол. журн. - 1985. - т.ХХI, вып. 4. - С. 87-89.
8. Исследование ферментов дезаминирования глицина в мышечной ткани карпа /Яковенко Б.В., Грубинко В.В., Третяк А.П. и др.// У Всесовзн. биохим. с"езд: Тез. докл. - Киев, 1986. - т. 3. - С.291-292.
9. Яковенко Б.В., Грубинко В.В., Яковенко А.Ф. Активность глутаминсинтетазы в тканях карпа в условиях голодания // Гидробиол.журн. - 1986. - т. 22, 4. - С. 74-78.

10. Грубинко В.В., Яковенко Б.В., Явоненко А.Ф. Влияние катионов металлов на глутаминсинтетазную активность печени и мышечной ткани карпа чешуйчатого // У Всесоюзн. биохим. с"езд: Тез. докл. - Киев, 1986. - т. 2. - С. 240-241.
11. Грубинко В.В., Яковенко Б.В., Явоненко А.Ф. Исследование активности ферментов системы детоксикации аммиака в организме карпа // У Всесоюзн. биохим. с"езд: Тез. докл. - Киев, 1986. - т. 2. - С. 241-242.
12. Яковенко Б.В., Грубинко В.В., Жиденко А.А., Явоненко А.Ф. Сезонная динамика глицина в водоемах и мышечной ткани карпа // Гидробиол. журн. - 1985. - № 6438-85 Дел. - 12 с.
13. Влияние бычьего инсулина на содержание некоторых метаболитов в мышечной ткани карпа чешуйчатого /Яковенко Б.В., Крутовский С.В., Шандрук Р.Н. и др. // Гидробиол. журн. - 1986. - № 5723-В 86 Дел. - 12 с.
14. Грубинко В.В., Яковенко Б.В., Явоненко А.Ф. Некоторые ферментативные пути образования аммиака у карпа при голодании // Гидробиол. журн. - 1986. - № 8742-В 86 дел. - 11 с.
15. Грубинко В.В., Яковенко Б.В., Явоненко А.Ф. Субклеточная локализация глутаминсинтетазной активности в мышечной ткани и печени карпа // Укр.биохим.журн. - 1987. - т.59, вып. 3. - С. 73-76.
16. Яковенко Б.В., Грубинко В.В., Явоненко О.Ф. Всмоктування гліцину в шлунково-кишковому тракті коропа // У Укр. біохім. з"їзд: Тез. доп. - Київ, 1987. - ч. 2. - С. 324.
17. Яковенко Б.В., Жиденко А.О., Явоненко О.Ф. Вплив температури на вміст гліцину в окремих органах коропа // У Укр. біохім. з"їзд: Тез. доп. - Київ, 1987. - ч. 2. - С. 324-325.
18. Грубинко В.В., Яковенко Б.В., Явоненко А.Ф. Влияние голодания на активность аргиназы и содержание мочевины у карпа *Cyprinus carpio* // Вопр. ихтиол. - 1987. - № 4. - С. 690-692.
19. Явоненко А.Ф., Яковенко Б.В., Грубинко В.В., Жиденко А.А. Ферментативная адаптация азотистого обмена карпа к голоданию // Первый симпозиум по экологической биохимии рыб: Тез. докл. - Ярославль, 1987. - С. 224-226.
20. Яковенко Б.В., Явоненко А.Ф., Грубинко В.В., Жиденко А.А. Особенности функционирования ферментативных путей образования энергии у карповых рыб в условиях зимовки // Экологическая энергетика животных: Всесоюзн. совещание. Тез. докл. - Суздаль, Пушкино, 1988. - С. 214.

21. Явоненко А.Ф., Яковенко Б.В., Грубинко В.В., Жиденко А.А. Глутаминсинтетазная и глутаминовая активность в организме молоди карпа при выходе из зимовки // Рыб. хоз-во. - Киев, 1988. - вып. 42. - С. 45-49.
22. 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 // Рыб. хоз-во. - Киев, 1989. - вып. 43. - С. 24-29.
23. Яковенко Б.В., Грубинко В.В., Явоненко А.Ф. Малат-, сукцинат- и лактатдегидрогеназная активность печени и белых мышц карпа в период зимовки // Гидробиол. журн. - 1989. - № 2646-В 89 Деп. - 8 с.
24. Жиденко А.А., Яковенко Б.В., Явоненко А.Ф. Состояние энергетической системы в тканях у зимующей молоди карпа // Гидробиол. журн. - 1990. - № 61-В 90 Деп. - 25 с.
25. Яковенко Б.В., Явоненко А.Ф. Влияние температуры акклимации на скорость дезаминирования глицина в белой мускулатуре и гепатопанкреасе карпа // Гидробиол. журн. - 1990. - № 4879-В 90 Деп. - 14 с.
26. Яковенко Б.В., Явоненко А.Ф. Глюкозилаткарболигазная активность гепатопанкреаса и белых мышц карпа // Гидробиол. журн. - 1991. - № 3561-В 91 Деп. - 12 с.
27. Яковенко Б.В., Явоненко О.Ф. "Малик"-ензиматична активність гепатопанкреасу та білих м'язів коропа лускатого // УІ Укр. біохім. з'їзд: Тез. доп. - Київ, 1992. - ч. I. - С. 154.

Підписано до друку 17.07.93

Тираж 100 экз.

464022

152350
AV 28.500