

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ГІДРОВІОЛОГІЇ

На правах рукопису

КОНОВЕЦЬ ІГОР МИКОЛАЙОВИЧ

ВПЛИВ ТОКСИКАНТІВ НА МЕТАБОЛІЗМ АМІАКУ У РИВ
ПРИ РІЗНИХ ТЕМПЕРАТУРАХ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА

03.00.18 - гідробіологія

03.00.04 - біохімія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ - 1994

AB 37.277



00755770 (V)

Додаток до Звізнення в Інституті гідробіології НАН України

- Науковий керівник: доктор біологічних наук О. М. АРСАН
- Офіційні опоненти: доктор біологічних наук В. Д. Соломатіна
 доктор біологічних наук, професор
 М. М. Великий
- Провідна організація: Київський Національний університет
 України ім. Тараса Шевченка

Захист відбудеться "16" 12 1994 р. о 14⁰⁰ год.
 на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016 19 01 при
 Інституті гідробіології НАН України за адресою: м. Київ,
 просп. Героїв Сталінграду, 12

В дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту
 гідробіології НАН України.

Автореферат розісланий "15" 11 1994 р.

Вчений секретар
 спеціалізованої ради
 кандидат біологічних наук

H. Смирнова

Н. М. Смирнова

ЛНБ ім. В. Стефаніка
 АН України

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Поглиблення токсичного забруднення прісних водойм призводить до формування умов сумісної дії на гідробіонти токсикантів техногенного і біогенного походження. У зв'язку з цим виникає потреба вивчення механізмів дії сумішей токсичних речовин та можливостей адаптації гідробіонтів до них з метою розробки методів біомоніторингу та засобів керування біопродукційними процесами.

В даний час особливо актуальним є дослідження впливу на організм промислових видів риб важких металів, в першу чергу, свинцю і нікелю, накопичення яких останнім часом в прісних водоймах басейну Дніпра є одне з найбільших (Линник П.М. и др., 1986, 1993; Белокін В.М., 1993). Одним із найпоширеніших токсикантів біогенного походження у водному середовищі, особливо при застосуванні методів інтенсивної аквакультури, є аміак (Константинов А.С. и др., 1987; Руссо Р.К. и др., 1989). При цьому встановлено, що суміші важких металів та аміаку для риб є високотоксичними (Katz B., 1979; Bhattacharya T. et al., 1985). Їх дія викликає посилення катаболізму білків у організмі риб, утворення значних кількостей аміаку, що призводить до розвитку вторинного ендогенного аміакового токсикозу (Лукьяненко В.И., 1983). В зв'язку з тим, що рівень аміаку в організмі визначає життєздатність риб, є актуальним дослідження систем забезпечення його гомеостатичного рівня за дії токсикантів. У нормі головна роль в підтримці фізіологічного рівня аміаку у коропа належить глутаміновій системі детоксикації (Стево'н У., 1976; Грубинко В.В., 1988, 1991). Функціонування систем забезпечення гоме-

остаю аміаку у риб за дії токсикантів практично не вивчено.

Мета і завдання досліджень. Вивчити функціонування глутамінової системи зв'язування і виведення аміаку та стан реакцій переамінування при спільній дії свинцю, нікелю, аміаку та їх сумішей за різних температур водного середовища.

В завдання досліджень входило:

1. Дослідження накопичення та дії аміаку, свинцю і нікелю на зв'язування та функціонування систем виведення ендogenous аміаку у коропа в залежності від температури.
2. Вияснення взаємного впливу аміаку і досліджуваних металів у суміші на гомеостаз аміаку в організмі.
3. Вивчення особливостей азотового обміну і механізмів підтримання фізіологічного рівня аміаку у мозку риб при досліджуваних видах токсикозів за різних температур водного середовища.

Наукова новизна і практичне значення роботи. Одержано нові дані про дію токсикантів за різних температур водного середовища на конкретні ланки системи метаболізму аміаку, співвідношення інтенсивності його зв'язування та виведення та причини накопичення в тканинах.

Вперше встановлено різницю у дії сумішей свинцю з аміаком і нікелю з аміаком, викликану відмінностями у характері їх хімічної взаємодії, яка полягає у прояві синергізму токсичності свинцю і аміаку та антагонізму нікелю і аміаку.

Виявлено температурну модуляцію накопичення металів за індивідуальної дії та у сумішах з аміаком, прояву ступеня токсичної дії на складові компоненти системи метаболізму аміаку та рівень його накопичення у мозку риб.

Зміна співвідношення інтенсивності зв'язування та виве-

дення аміаку, а також його рівень у мозку пропонується як інтегральний показник для оцінки фізіологічного стану риб при біомониторингу інтоксикації важкими металами і їх сумішами з іншими токсикантами. Розроблено спосіб оцінки аміакового забруднення водного середовища за показниками функціонування глутамінової системи детоксикації аміаку.

Апробація роботи. Результати досліджень доповідались на II Всесоюзному симпозиумі по екологічній біохімії риб (Ярославль, 1990); II Всесоюзній конференції по рибогосподарській токсикології (С.-Петербург, 1991); VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992); VIII Науковій конференції по екологічній біохімії і фізіології риб (Петрозаводськ, 1992); Міжнародній конференції "Навколишнє середовище і здоров'я" (Чернівці, 1993).

Об'єм роботи. Робота складається із вступу, 6 глав, заключення, висновків і списку літератури та додатку. Бібліографічний перелік нараховує 225 джерел, у тому числі 132 зарубіжних. Дисертація викладена на 143 сторінках, містить 39 іл., 6 таблиць та додаток.

Матеріали і методи досліджень. Досліди проводили на коропі (*Syrpinus carpio L.*) річного віку масою 180-200 г. у 100-літрових акваріумах на відстояній водопровідній воді за умов витримування стандартних рівнів гідрохімічних показників. Вміст кисню у воді акваріумів підтримували на рівні 7,0-8,0 мг/л, вуглекислого газу - 2,2-2,8 мг/л. Величина рН коливалася в межах 7,7-7,9. Температура води під час проведення дослідів (7, 20 і 25°C) підтримувалася автоматично. Вивчали вплив аміаку (концентрація неіонізованої форми 0,1 мг/л), свинцю (0,2 мг/л), нікелю (0,02 мг/л) окремо та

сумішей металів з аміаком. Задана концентрація досягалась внесенням у воду акваріумів розрахункових кількостей нітрату свинцю, хлориду нікелю та хлориду амонію. Період акліматизації становив 14 діб.

Досліджували тканини м'язів, печінки, вябер, нирок, мовку і слизова оболонка кишечника. Вивчали рівень глутамінсинтетазної (ГС) активності фосфатним методом (Евстигнєєва З. Г. и др., 1980; Грубинко В. В. и др., 1987); активності глутамінази (ГЗ) за допомогою фенол-гіпохлоритного методу (Магарламов А. Г. и др., 1979), аланін(АлАТ)- і аспарат(АсАТ)-амінотрансфераз (Осадчая Л. М., 1982), а також вміст аміаку по реакції з нітропруссид-фенольним реактивом (Seligson D. et al., 1951) та глутаміну (Силакова А. И. и др., 1962). Вміст білку визначали за Lowry O. H. et al., 1951.

Накопичення свинцю і нікелю визначали методом атомно-адсорбційної спектрофотометрії на приладах ААС-1 і ААС-3 фірми Carl Zeiss після спалювання зразків тканин у перегнаний концентрованої азотній кислоті.

Результати аналізів піддані статистичній обробці з використанням t-критерію Стьюдента при повторності дослідів 5-7.

ЗМІСТ РОБОТИ

Основним критерієм, який визначає фізіолого-біохімічну норму організму, є підтримання гомеостатичного рівня певних метаболітів, що займають центральне місце у регуляції обміну речовин, співвідношенні катаболічних та анаболічних процесів, формуванні фізіологічних реакцій організму. У прісноводних костистих риб одним з таких інтермедіатів обміну речовин є аміак. Співвідношення швидкостей продукування, де-

токсикації та виведення останнього має вирішальне значення у забезпеченні їх життєздатності. При несприятливих умовах зовнішнього середовища, у тому числі за дії токсикантів різної природи, зміна аміакового гомеостазу в організмі риб, як показано у ряді фундаментальних робіт (Лукьяненко В.И., 1983, Mouano F. J., 1988) є лімітуючим фактором визначення стійкості організму в цих умовах.

Виявлено, що у коропа головним шляхом детоксикації і виведення аміаку є глутамінова система, суть функціонування якої полягає в його зв'язуванні у місцях утворення (печінка, м'язи, мозок і ін.) в нетоксичний глутамін в глутамінсинтезазній реакції, транспорті останнього у зябри з наступним розщепленням глутаміназою і виведенням аміаку в зовнішнє середовище (Грубинко В.В., 1988, 1991; Creac'h Y., 1966, 1976). Додатковим шляхом детоксикації аміаку є аланіновий, суть якого полягає у амінуванні пірувату в аланінамінотрансферазній реакції у м'язах в аланін, транспорті останнього у печінку з наступним переамінуванням і утворенням пірувату, який використовується для біосинтезу глікози шляхом глікогеногенезу (Медлер Д., 1980; Смирнов А.В., 1984). В той же час не відомо про реакцію даних систем за дії несприятливих факторів середовища, в тому числі при інтоксикаціях. Одним із визначальних факторів впливу на обмін речовин у риб при дії важких металів є їх накопичення в організмі риб.

Накопичення свинцю і нікелю за їх дії окремо та в сумішах в аміаком при різних температурах водного середовища.

Вивчення накопичення свинцю при дії окремо та в суміші з аміаком характеризується однаковими закономірностями, що

свідчить про відсутність впливу екзогенного аміаку на цей процес. Найвищий рівень накопичення металу в тканинах в умовах підвищеної концентрації у воді виявлено у печінці та слизовій кишечника, де його рівень порівняно з контрольними рибами збільшується максимально в кишечнику в 2,0, а в печінці - в 3,0 рази. В інших досліджуваних тканинах вірогідної різниці зростання вмісту свинцю не встановлено, а в м'язах його вміст не відрізнявся від показників контролю. Слід відмітити збільшення нагромадження свинцю із зростанням температури водного середовища. Наприклад, в печінці при температурах 7, 20 і 25°C вміст металу збільшувався за дії свинцю окремо у 1,2; 2,0 та 3,0 рази відповідно, а за дії суміші свинцю з аміаком - відповідно у 1,3; 2,1 та 2,9 рази.

Збільшення вмісту нікелю за його дії окремо при 7 та 25°C було статистично вірогідним у всіх досліджуваних тканинах. Максимальним рівнем накопичення характеризуються м'язи та кишечник, де його рівень збільшувався порівняно з контролем у 4 та 2,5 рази відповідно. При 20°C зростання вмісту нікелю у 1,5 рази виявлено у кишечнику, зябрах, нирках і печінці, а у м'язах його накопичення не відбувається. Таким чином, на відміну від дії свинцю, накопичення нікелю відбувається більш інтенсивно при низьких і підвищених температурах. Іншим фактором, який істотно впливав на нагромадження цього металу у тканинах була присутність аміаку зовнішнього середовища. За дії суміші нікелю з аміаком накопичення металу у тканинах було на 30 - 50% нижчим, ніж за дії нікелю окремо.

Температурні відмінності у накопиченні свинцю та нікелю, а також різниця їх нагромадження при дії в сумішах з аміаком,

можна пояснити особливостями їх фізико-хімічної взаємодії з біомолекулами та аміаком. Для іону нікелю, на відміну від свинцю, характерна висока швидкість обміну лігандів, більша спорідненість до кисневих та азотних донорних електронних пар, ніж до сірчаних, а також висока стійкість його аміакового комплексу [Katz B., 1979; Martin B.R., 1983]. Цим пояснюється як висока проникність іонів нікелю в організм і його накопичення навіть у м'язах, так і відсутність прямої температурної залежності накопичення у зв'язку з інтенсивним виведенням нікелю на відміну від свинцю. Свідченням останнього є виявлений нами значний рівень нікелю у нирках.

Виявлені факти позначилися на стані систем підтримання гомеостазу аміаку.

Вплив токсикантів на функціонування систем зв'язування та виведення аміаку в залежності від температури водного середовища.

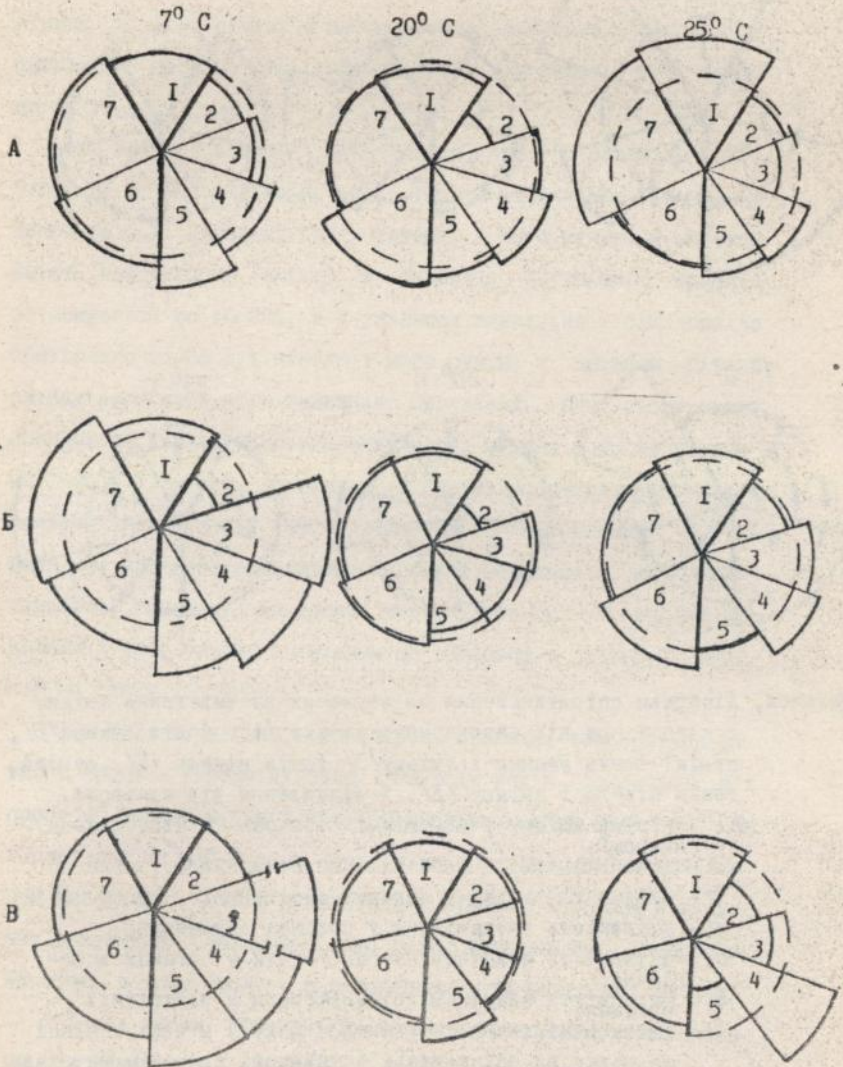
В зв'язку з виявленою дією температури на процеси накопичення токсикантів насамперед вивчено її вплив на метаболізм аміаку.

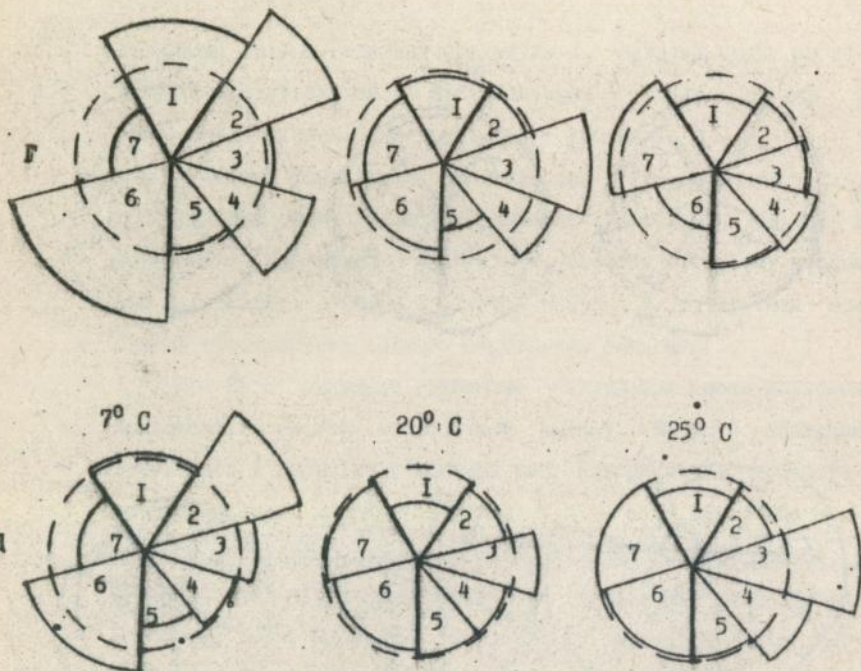
У результаті проведених досліджень встановлено, що глутамінова система активно функціонує за всіх досліджуваних температурах. При 7 і 25⁰С виявлено посилення переамінування в АЛАТ реакції в м'язах, печінці та нирках, що можна пояснити зростанням її ролі в виведенні аміаку за цих температур, для яких характерно посилення його утворення (Среас'н У., 1966; Сорвачев К. Ф., 1982). Функціонування даних систем є достатнім, оскільки рівень глутаміну перевищує рівень аміаку, а концентрація останнього у тканинах виведення знач-

но нижча, ніж у тканинах продукування. Завдяки цьому забезпечується витримування фізіологічних рівнів аміаку у внутрішніх органах, в першу чергу - у мозку.

У нашому дослідженні одержано дані, які розширюють уяву про провідну роль систем зв'язування і виведення аміаку в формуванні адаптивних механізмів захисту організму коропа при дії аміаку, нікелю та свинцю окремо і у сумішах при різних температурах водного середовища (малюнок).

При 20°C виявлено найменше відхилення досліджуваних компонентів систем метаболізму аміаку. В усіх випадках токсикозів у внутрішніх органах риб витримувався гомеостатичний рівень аміаку. Його вміст в органах виведення знижується у випадку аміакового і свинцевого токсикозів і близький до контрольних значень при інших токсикозах. По-перше, це є наслідком нормального функціонування глутамінової системи зв'язування. По-друге, виявлено збільшення вмісту глутаміну та рівня активності глутамінази в тканинах виведення, що забезпечує зростання інтенсивності виведення аміаку саме цим шляхом. Особливо це проявляється за дії нікелю і його суміші з аміаком. Підтвердженням цього є інгібування в обох випадках активності АЛАТ у внутрішніх органах на 5.5 % і 14.6 % відповідно, у органах виведення - на 23.6 % і 4.7 %. При інших токсикозах виявлено активацію АЛАТ в тканинах продукування аміаку на 10-15 % і близькі до контрольних значення її активності у тканинах виведення. Таким чином, при температурі водного середовища 20°C адаптивні системи підтримання аміакового гомеостазу у риб функціонують на достатньому рівні. Це дає можливість вважати дану температуру сприятливою для забезпечення організмом функціонуван-





Малюнок. Діаграми співвідношення зв'язування та виведення аміаку в коропа при дії екзогенного аміаку /А/, іонів свинцю/Б/, суміші іонів свинцю і аміаку/В/, іонів нікелю /Г/, суміші іонів нікелю і аміаку /Д/, % відхилення від контролю.

- 1 - рівень аміаку у внутрішніх органах /м'язи, печінка, мозок/;
- 2 - рівень аміаку у органах виведення /з'ябба, нирки/;
- 3 - рівень глутаміну у органах виведення;
- 4 - активність глутамінази у органах виведення;
- 5 - активність аланінамінотрансферази у органах виведення;
- 6 - активність аланінамінотрансферази у внутрішніх органах;
- 7 - інтенсивність зв'язування аміаку у м'язах, печінці та мозку за показниками активності глутамінсинтетази та вмісту глутаміну.

Штрихове коло "----" - умовний контроль, прийнятий за 100%.

ня систем захисту до вказаних токсикантів. У випадку дії нікелю і його суміші з аміаком слід відмітити більш значну активацію систем, що забезпечують підтримку гомеостазу аміаку.

На відміну від цієї температури, при 7°C рівень аміаку, близький до контрольного, витримується тільки при аміаковому токсикозі. У випадках дії свинцю і його суміші з аміаком вміст ендogenous аміаку в тканинах внутрішніх органів збільшується на 10-20%, а у тканинах виведення - близький до контрольного. За дії нікелю і його суміші з аміаком рівень аміаку зростає у всіх тканинах організму. При цьому слід зазначити значне зниження активності систем його зв'язування. За дії аміаку, свинцю і їх суміші значення показників системи зв'язування аміаку близькі до контрольних. В усіх випадках виявлено збільшення значення показників, які характеризують систему виведення через глутамін. У випадку дії нікелю і його суміші з аміаком це виражено в меншій мірі, ніж за інших токсикозів.

Як було відмічено, у контролі зниження температури активує процеси переамінування. За всіх видів токсичної дії процеси переамінування при 7°C активуються ще значніше. Це характерно як для тканин внутрішніх органів, так і для тканин виведення, окрім випадків дії нікелю з аміаком в тканинах виведення. Зазначимо, що роль трансаміназ, очевидно, зростає, в тому числі і в детоксикації та виведенні аміаку.

Таким чином, при низьких температурах водного середовища дія токсикантів викликає активацію процесів зв'язування і виведення аміаку порівняно з 20°C. Однак, накопичення аміаку практично у всіх випадках токсикозів у внутрішніх органах, а

у випадку дії свинцю і аміаку та, особливо, нікелю і його суміші з аміаком - у мозку риб (табл.), свідчить про недостатність забезпечення ними його зв'язування і виведення. Це може бути результатом додаткової дії токсикантів на фоні несприятливого впливу низької температури.

Температурно-токсикологічну модуляцію змін у обміні аміаку ми спостерігали і при 25°C в порівнянні з 20°C. При токсикозах, викликаних аміаком, свинцем і їх сумішшю, рівень аміаку у внутрішніх органах значно збільшувався, відповідно на 37.6, 14.8 і 11.0 %. Аналогічно 7°C накопичення аміаку супроводжувалося активацією глутамінової системи зв'язування та глутаміназного шляху виведення. У меншій мірі в порівнянні з 7°C активувалася, а у випадку дії свинцю з аміаком, нікелю і його суміші з аміаком, інгібувалася АЛАТ. На фоні зниження процесів переамінування в нормі при 25°C у порівнянні з 7°C, їх пригнічення за токсичного навантаження свідчить про більшу чутливість до токсичної дії та зниження їх ролі у підтримці аміакового гомеостазу. Слід зазначити відмінності впливу нікелю і його суміші з аміаком від інших випадків при цій температурі. При цьому спостерігалось зниження вмісту аміаку в організмі в цілому і значна активація глутамінової системи виведення.

У зв'язку з цим слід звернути увагу на різнохарактерний взаємозв'язок між реакцією організму і накопиченням досліджуваних металів у залежності від температури. Хоча при дії нікелю його накопичення в тканинах при 7 і 25°C було вищим, ніж при 20°C, при 7°C зміни були значнішими, ніж при 25°C. У випадку дії суміші нікелю з аміаком, коли накопичення нікелю в більшості тканин у порівнянні з контролем не ви-

Таблиця. Вплив токсикантів на вміст аміаку (мкМ/г тканини), глутаміну (мкМ/г тканини), активність глутамінсинтетази (ГС; мкмоль P₂/мг білку/хв.), глутамінази (ГЗ; мкмоль аміаку/мг білку/хв.) та аланінамінотрансферази (АЛАТ; мкмоль піривату/мг білку/хв.) у мозку риб при різних температурах водного середовища. M±m; n=5.

Умови дослідження	аміак	глутамін	ГС	ГЗ	АЛАТ
7 ⁰ C					
контроль	2.80 ± 0.19	17.50 ± 1.44	11.82 ± 0.84	13.36 ± 1.06	1.79 ± 1.43
NH ₃	3.09 ± 0.21	20.85 ± 1.87	11.25 ± 1.03	10.10 ± 0.67*	0.52 ± 0.08*
Pb ₂₊	2.90 ± 0.18	16.66 ± 1.55	10.82 ± 0.79	11.94 ± 0.88	4.55 ± 0.38*
Pb ₂₊ ++NH ₃	3.09 ± 0.22	21.69 ± 1.93	11.01 ± 0.81	12.74 ± 1.07	3.66 ± 0.29*
Ni ₂₊	6.10 ± 0.44*	13.70 ± 0.99	9.61 ± 0.74	14.92 ± 1.12	4.45 ± 0.32*
Ni ₂₊ ++NH ₃	4.20 ± 0.37*	12.40 ± 0.83*	9.64 ± 0.42*	13.52 ± 1.21	1.83 ± 0.17
20 ⁰ C					
контроль	6.40 ± 0.54	5.30 ± 0.46	7.77 ± 0.63	16.88 ± 1.36	5.57 ± 0.39
NH ₃	6.80 ± 0.57	3.54 ± 0.26*	7.21 ± 0.58	15.48 ± 1.14	1.42 ± 1.05*
Pb ₂₊	6.27 ± 0.48	5.75 ± 0.43	6.98 ± 0.51	12.76 ± 0.93*	4.50 ± 0.22
Pb ₂₊ ++NH ₃	5.24 ± 0.41	4.75 ± 0.36	6.75 ± 0.52	14.03 ± 1.23	2.03 ± 0.17*
Ni ₂₊	6.70 ± 0.53	5.28 ± 0.39	7.81 ± 0.60	9.72 ± 0.71*	4.45 ± 0.38
Ni ₂₊ ++NH ₃	4.50 ± 0.31*	8.28 ± 0.63*	7.90 ± 0.66	11.16 ± 0.92*	5.20 ± 0.49
25 ⁰ C					
контроль	3.80 ± 0.27	6.30 ± 0.51	6.77 ± 0.56	10.04 ± 0.74	5.64 ± 0.49
NH ₃	5.18 ± 0.38*	5.93 ± 0.47	9.12 ± 0.74*	11.40 ± 0.87	4.79 ± 0.33
Pb ₂₊	4.27 ± 0.32	7.13 ± 0.65	9.52 ± 0.86*	6.17 ± 0.51*	6.02 ± 0.48
Pb ₂₊ ++NH ₃	4.27 ± 0.34	7.13 ± 0.57	9.37 ± 0.78*	8.93 ± 0.71	1.79 ± 0.14*
Ni ₂₊	3.90 ± 0.29	7.13 ± 0.66	6.49 ± 0.53	11.44 ± 0.97	5.93 ± 0.43
Ni ₂₊ ++NH ₃	3.84 ± 0.26	6.00 ± 0.51	5.47 ± 0.50	9.44 ± 0.86	4.39 ± 0.35

* - результат вірогідний

явлено, вони проявляються аналогічно дії нікелю окремо. Це свідчить про те, що прояв токсичної дії даного металу в залежності від температури, скоріше всього, визначається не рівнем його накопичення, а характером взаємодії з біологічними структурами, яка регулюється фізико-хімічними властивостями іонів металів і температурою. У випадку дії свинцю і його суміші з аміаком, для яких спостерігалася пряма температурна залежність накопичення металу, більш значні відхилення досліджуваних показників спостерігали при 7°C (найменше накопичення) і 25°C (найбільше накопичення). Це також свідчить про більшу залежність прояву дії свинцю, як і нікелю, від температури, ніж від його накопичення.

Порівняння токсичності металів і їх сумішей з аміаком показало, що в цілому присутність аміаку незначно впливає на модифікацію його метаболізму в порівнянні з дією металів окремо. Однак, в деяких випадках у сумішах проявляється взаємний вплив токсикантів. Відмічено інгібування переамінування за дії свинцю і аміаку на відміну від їх впливу окремо. Для дії нікелю характерні більш значні відхилення абсолютних значень досліджуваних показників, ніж за впливу його суміші з аміаком. Аналіз даних дозволяє констатувати прояв синергізму для суміші свинцю з аміаком та антагонізму - для суміші нікелю з аміаком, що підтверджується вищим рівнем аміаку у мозку дослідних риб за дії суміші свинцю з аміаком порівняно з свинцем та зворотною залежністю для випадків нікель - нікель плюс аміак. Це може бути результатом різного хімічного відношення даних металів до аміаку (Katz B., 1979).

Вплив токсикантів на метаболізм аміаку в мозку коропа.

Суттєві зміни у функціонуванні центральної нервової системи, як відомо, являються інтегральним показником ступеню пошкодження організму токсикантами. Визначається, що у риб нейро-фізіологічні зміни при інтоксикаціях викликаються не тільки їх безпосередньою дією, а, насамперед, аміаком, який інтенсивно утворюється в організмі за рахунок катаболічних процесів у відповідь на інтоксикацію (Лукьяненко В. И., 1983). В зв'язку з цим нами досліджувався метаболізм аміаку у мозку коропа за дії токсикантів. Зміна досліджуваних показників у мозку на інтоксикацію була різноманітною і залежала від температури (табл.).

При 20°C рівень аміаку у мозку порівняно з контролем не збільшувався, а у випадках дії сумішей металів з аміаком - зменшувався. Причиною цього можна вважати низьку інтенсивність його продукування у цьому органі, що підтверджується зменшенням активності глутамінази та аланінамінотрансферази, функції яких у мозку пов'язують саме з участю в процесах окислювального дезамінування амінокислот (Meister A., 1965). Крім того, витримування гомеостатичного рівня аміаку може забезпечуватися нормальним функціонуванням систем його зв'язування і виведення в інших тканинах при цій температурі за даних типів токсичної дії, про що вказувалося раніше. Наведені факти дають можливість припустити формування при дії досліджуваних факторів при 20°C захистного бар'єру, який як засіб запобігання пошкодженню мозку характерний для більшості тварин (Меерсон Ф. З., 1981).

При всіх типах токсикозів зниження та підвищення темпе-

ратури порівняно з 20°C приводило до посилення токсичної дії, оскільки вміст аміаку у мозку зростає. Особливо це проявлялося за дії нікелю та його суміші з аміаком при 7°C та аміаку при 25°C. Як зазначалося раніше, при цих температурах відбувається збільшення утворення ендogenous аміаку за рахунок посилення катаболізму білків при дії токсикантів та порушення співвідношення процесів його зв'язування і виведення. Це призводить до накопичення аміаку в організмі вцілому (малюнок). Аналогічне явище імовірно і для мозку, оскільки при дії іонів важких металів та їх сумішей з аміаком, особливо при 7°C, зростає активність аланінамінотрансферази. Слід зазначити, що найбільш значне зростання вмісту аміаку супроводжується збільшенням активності глутамінази, яке спостерігається у випадках дії нікелю і суміші нікелю з аміаком при 7°C і аміаку при 25°C. Це свідчить про підвищення участі в його утворенні саме цього ферменту. Додатковою причиною розвитку аміачного токсикозу при 7°C є низька інтенсивність зв'язування аміаку глутаміновою системою. У випадку дії нікелю та його суміші з аміаком це відбувається за рахунок зниження активності глутамінсинтетази рівня глутаміну. Дане явище можливе завдяки високій здатності до проникнення нікелю в організм, в тому числі у мозок. В інших випадках токсикозів спостерігається витримування високих рівнів глутаміну, що слід пов'язати з участю глутамінової системи не стільки в детоксикації аміаку у мозку, скільки в відомих для неї функціях регуляції пулу нейромедіаторів (глутамат, аміак, гамааміномасляна кислота) (Розанов А. Я. и др., 1985) та зростання ролі глутаміну як енергетичного субстрату за дії несприятливих умов зовнішнього се-

редовища (Begun S. J., 1987).

При 25°C роль глутамінової системи в детоксикації аміаку у мозку зростає, що підтверджується активацією глутамінсинтетази та рівня глутаміну при дії свинцю і його суміші з аміаком, та забезпеченням нею гомеостатичного рівня аміаку при дії нікелю та його суміші з аміаком. Найбільш негативні зміни, що виражаються в значному накопиченні аміаку, зростанні активності глутамінази та зниженні вмісту глутаміну, виявлені при дії аміаку зовнішнього середовища. Висока токсичність аміаку саме при цій температурі можна пояснити зростанням в організмі при підвищенні температури частки його найбільш токсичної неіонізованої форми (Руссо Р. К. и др., 1989).

Враховуючи, що зміни досліджуваних показників при 7 та 25°C мають багато спільних рис, можна констатувати, що нивькі та високі температури сприяють підвищенню чутливості мозку риб до досліджуваних токсикантів у взятих концентраціях.

Оцінка токсичності середовища для риб за показниками глутамінової системи.

З результатів роботи виходить, що токсичний та температурний вплив на метаболізм аміаку у коропа викликає активацію ферментних систем його детоксикації і виведення, порушення яких викликає інтоксикацію організму риб ендогенним аміаком. Оскільки зазначене явище характерне для всіх випадків токсичної дії, можливий єдиний підхід в оцінці впливу токсикантів на азотистий гомеостаз у риб.

Виявлена висока залежність обміну аміаку у мозку від ступеня збалансованості функціонування глутамінової системи

в організмі коропа дозволила запропонувати показник для оцінки порушення азотого обміну в умовах токсичної дії. Проведений регресійний та кореляційний аналіз виявив високий ступінь кореляції між рівнем аміаку у мозку та відношенням активності глутамінсинтетази у м'язах і печінці та глутамінази у в'ябрах, особливо при 20 і 25°C.

Співвідношення активностей вказаних ферментів в даний час розглядається як показник спрямованості обміну аміаку у тварин і запропоновано для оцінки азотого гомеостазу у печінці ссавців (Vincent N. et al., 1989).

Для всіх температур при досліджуваних типах токсикозів нами виявлено зворотню залежність між рівнем аміаку у мозку та показником відношення активностей глутамінсинтетази в м'язах і глутамінази у в'ябрах. Встановлено, що значення даного показника коливається в залежності від прояву токсичної дії в межах 4-12 при 7 та 25°C і 8-11 при 20°C. Для контрольних риб його значення становить 10 ± 1 при всіх досліджуваних температурах водного середовища. Вирогідне відхилення рівня аміаку в мозку від норми спостерігається при значеннях показника менше 6. Отже, зменшення показника відношення активності глутамінсинтетази в м'язах до активності глутамінази у в'ябрах вказує на недостатність інтенсивності зв'язування і виведення аміаку в організмі і його накопичення у мозку та розвиток стійкої інтоксикації організму риб.

Вказане співвідношення пропонуємо в якості тест-показника оцінки порушення фізіолого-біохімічного статусу організму риб при вказаних типах токсикозів.

ВИСНОВКИ

1. Виявлено температурну залежність функціонування систем виведення аміаку. При 7, 20 і 25°C водного середовища активною є глутамінова система. При 7 і 25°C додатково активується виведення аміаку з допомогою аланінамінотрансферази.

2. При 20°C аміна досліджуваних показників на дію токсикантів у досліджуваних концентраціях є мінімальною. Виявлена активація глутамінового шляху виведення аміаку, який частково інгібується тільки за дії нікелю і його суміші з аміаком.

3. При 7°C дія токсикантів призводить до накопичення аміаку у внутрішніх органах, а у випадку дії свинцю з аміаком та нікелю і його суміші з аміаком - у мозку риб, що свідчить про недостатність ефективності функціонування систем його зв'язування та виведення. Виявлено зростання ролі аланінамінотрансферази в процесах регуляції гомеостазу аміаку.

4. При 25°C у випадках дії аміаку, свинцю і їх суміші вміст аміаку в організмі зростає. Виявлено підвищення ролі глутамінової системи і зниження долі аланінамінотрансферази у підтримці аміакового гомеостазу.

5. Накопичення свинцю в організмі риб збільшується з підвищенням температури і не залежить від присутності аміаку у водному середовищі. Накопичення нікелю зростало при 7 і 25°C порівняно з 20°C у випадку його дії окремо та інгібувалося за всіх досліджуваних температур у присутності аміаку зовнішнього середовища.

6. Токсична дія металів окремо та в суміші з аміаком у досліджуваних концентраціях визначається не рівнем їх нако-

пичення в тканинах, а температурою водного середовища та інтенсивністю метаболічних процесів.

7. Виявлено різницю у токсичності досліджуваних металів в залежності від температури. Вплив свинцю є значнішим при 25°C, а нікелю - при 7°C. Вплив нікелю на метаболізм аміаку в порівнянні з свинцем сильніший.

8. Встановлено відмінності у дії сумішей металів з аміаком, викликані різницею у характері їх хімічної взаємодії. Дія суміші свинцю з аміаком - синергічна, а нікелю з аміаком - антагоністична.

9. Дія досліджуваних токсикантів на метаболізм аміаку у коропа відбувається через вплив на конкретні компоненти системи його зв'язування та виведення, у результаті чого змінюється співвідношення інтенсивності цих процесів з накопиченням аміаку у тканинах. Останнє може бути лімітуючим фактором у визначенні толерантності організму риб до токсикантів.

Перелік опублікованих робіт по темі дисертації:

1. Грубинко В. В., Коновец І. Н., Арсан О. М., Явоненко А. Ф. Глутаминовый путь связывания аммония в кишечнике карпа // Гидробиол. журн. - 1992. - 28, 1. - С. 91-97.

2. Коновец І. Н., Грубинко В. В., Арсан О. М., Кулик В. А. Функционирование адаптивных систем детоксикации аммиака у карпа под воздействием температуры // Гидробиол. журн. - 1993. - 29, 5. - С. 47-52.

3. Коновец І. Н., Кулик В. А., Арсан О. М. и др. Влияние свинца на метаболизм аммиака у карпа при различных температурах водной среды // Гидробиол. журн. - 1994. - 30, 5. - С. 79-84.

4. Грубинко В. В., Арсан О. М., Коновец І. М. та ін. Спосіб оцінки токсичного забруднення середовища аміаком // За-

явка на авт. свід. N 44401175. Пов. рішення від 05.04.1994р. - 4 с.

5. Грубінко В. В., Коновець І. Н., Явоненко А. Ф. Очистка и некоторые свойства глутаминсинтетазы энтероцитов карпа//Ред. Гидробиол. журн.: Деп. в ВИНТИ, 1991. - N 3554-В91. - 14 с.

6. Грубінко В. В., Коновець І. Н., Явоненко А. Ф. Биохимические закономерности адаптации рыб к аммиаку//Второй Всес. симп. по экол. биох. рыб, Ростов Великий, дек. 1990 г.: Тез. докл. - Ярославль: Б. и, 1990. - С. 59-60.

7. Грубінко В. В., Коновець І. М., Явоненко О. Ф. Рівні біохімічної адаптації гідробіонтів до аміаку//Міжвуз. наук.-практ. конф., Чернігів, липень 1991: Тез. доп. - Чернігів: Б/в, 1991. - Ч. 1. - С. -96-98.

8. Грубінко В. В., Коновець І. Н., Явоненко А. Ф. Особенности азотистого обмена у рыб, адаптированных к аммиаку//Вторая Всес. конф. по рыбохоз. токс., С.-Пб., сент. 1991 г.: Тез. докл. - Рыбинск: Б. и., 1991. - Т. 1. - С. 140-142.

9. Жиденко А. А., Коновець І. Н., Явоненко А. Ф. Динамика использования энергетических субстратов в тканях зимующей молоди карпа//VIII Научная конф. по экол. физиол. и биох. рыб. 1992. Петрозаводск: Б. и. - С. 102-103.

10. Грубінко В. В., Коновець І. М., Явоненко О. Ф. Особенности взаимодействия аммиака с глутаминсинтетазой рыб *in vivo*//VI Укр. биох. в'їзд, Київ, червень 1992 р.: Тез. доп. - Київ: УСГА, 1992. - Ч. II. - С. 21.

11. Коновець І. М., Арсан О. М., Кулик В. О., Грубінко В. В. Азотистий обмін у рыб в умовах підвищеної концентрації свинцю в оточуючому середовищі//"Навкол. середов. і здоров'я". Міжн. наук. конф., Чернівці, березень 1993 р.: Тез. доп. - Чернівці: Б. в, 1993. - С. 198.

Аннотация

Коновец И. Н. Влияние токсикантов на метаболизм аммиака у рыб при различных температурах водной среды.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.00.18 - гидробиология и 03.00.04 - биохимия. Институт гидробиологии НАН Украины, Киев, 1994.

Защищается 9 научных работ и 1 заявка на изобретение, которые содержат теоретические исследования влияния аммиака, свинца, никеля и их смесей при температурах 7, 20 и 25°C на соотношении интенсивности связывания и выведения аммиака у карпа глутаминовым путем, а также с участием аланинаминотрансферазы. Установлено, что действие токсикантов осуществляется через влияние на конкретные компоненты метаболизма аммиака, в результате чего происходит изменение соотношения его связывания и выведения и накопление в тканях. Это является лимитирующим фактором в определении толерантности организма рыб к изученным токсикантам. Токсическое действие металлов отдельно и в смеси с аммиаком определяется не уровнем накопления в тканях, а температурой и физиолого-биохимическим состоянием организма. Обнаружены различия в воздействии смесей свинца с аммиаком и никеля с аммиаком, вызванные отличиями в природе их химического взаимодействия. Показано синергическое действие на метаболизм аммиака у карпа для смесей свинца с аммиаком и антагонистическое - для никеля с аммиаком. Предложен способ оценки токсического загрязнения среды по отклонениям параметров функционирования систем связывания и выведения аммиака.

Annotation

Konovets I.N. Effect of toxicants on ammonia metabolism in fish at different temperature of water environment.

Dissertation for competition on scientific degree the candidate of biological sciences on the specialties 03.00.18 - hydrobiology and 03.00.04 - biochemistry. 10 scientific articles and 1 claim for author's certificate are upholding, covered theoretical investigations on effect of unionized ammonia, lead, nickel and its mixtures on the ammonia 'binding:excretion' ratio in carp by glutamine pathway and also with participation of alaninetransaminase at 7, 20 and 25°C. It is established, that toxicants affect the definite steps of ammonia metabolism and cause the changing in ammonia 'binding:excretion' ratio and accumulation of ammonia in the tissues. It is limiting factor in the determination of the fish organism tolerance to the toxicants under study. Toxic effect of metals in investigated concentrations both individual and combined with ammonia, is formed mainly by physiological state of fish organism and temperature and rather less - by metal accumulation in the tissues. Variations in influence of $Pb^{2+}+NH_3$ and $Ni^{2+}+NH_3$ mixtures caused by distinctions in the chemical interaction nature between metal ions and unionized ammonia have been established. Additive effect of $Pb^{2+}+NH_3$ mixture and antagonistic effect of $Ni^{2+}+NH_3$ mixture on ammonia metabolism in common carp have been shown. The method for evaluation of water environment pollution based on deviations of the binding and excretion system parameters has been offered.

Ключові слова:

комплексний токсикоз, температура, карп, метаболізм аміаку

Післ. до друку 10.11.94.

Формат 60x84/16. Папір офс. Офс.друк.

Ум.друк арк. 0,9. Обл.-вид. арк. 1,0. Тираж 100 прим.

Зам. 156.

Поліграфічна дільниця Інституту економіки НАН України.

252011 м.Київ, вул. Печаса Мирного,26.

454952

AB 31.271

AB 31.271