

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ НА АКТИВНІСТЬ ТА РОЗПОДІЛ МІЖ ВІЛЬНОЮ ТА ЗВ'ЯЗАНОЮ АМФ-ДЕЗАМІАЗОЮ З БІЛИХ М'ЯЗІВ РОТАНА (*PERCCOTTUS GLENII L.*)

В. В. Гусак, В. І. Луцк

Прикарпатський національний університет

Наведено дані про вплив температури на розподіл між вільною та зв'язаною АМФ-дезаміазою з білих м'язів ротана.

Ключові слова: РОТАН, АМФ-ДЕЗАМІАЗА, ГІПОКСІЯ.

Підвищення температури води супроводжується зменшенням в ній концентрації кисню, що може призвести до гіпоксії. Раніше було встановлено, що гіпоксія викликає перерозподіл між вільною і зв'язаною формою АМФ-дезаміази в морської риби скорпени, яка, хоча й переносить добре гіпоксію і навіть короткочасну аноксію, реагує на такі зміни активацією гліколізу [1]. Також дослідники довели, що за стресових умов у вищих хребетних, цикл пуринових нуклеотидів функціонує [2, 3, 4], але в риб — при аноксії у сріблястого карася [5] та інтенсивному плаванні у лосося [6] — виявлено накопичення ІМФ і його перехід у аденілати лише при виході зі стресу. Таке роз'єднання у часі може мати важливе функціональне значення: за рахунок активації АМФ-дезаміази підтримується енергетичний заряд — через виведення АМФ і його перетворення у ІМФ. Функціонування циклу вимагає енергії, а вона в цей час у дефіциті. Тому накопичується ІМФ і пізніше переводиться у аденілати. Звідси видно, що ключовим ферментом у даних перетвореннях виступає АМФ-дезаміаза. Хоча цьому ферментові з риб і присвячено багато робіт, але вони переважно стандартного описового характеру, і можливість модифікації властивостей ферменту в результаті зміни фізіологічного стану риб не вивчалась.

Оскільки перерозподіл АМФ-дезаміази між вільною та зв'язаною фракціями був вивчений лишень в скорпени [1] під час гіпоксії, а також під впливом фізичної стимуляції у щурів [7] та лосося [8], то нами було поставлено за мету вивчити вплив температури на цей розподіл в білих м'язах ротана.

Матеріали і методи

Ротана (*Perccottus glenii L.*) масою 15–60 г та довжиною тіла 7–15 см відловлювали у с. Куکیلники (Галицький р-н, Івано-Франківська обл.) і утримували в аерованій дехлорованій воді при температурі +19°C протягом двох тижнів.

При цій температурі риб витримували протягом різних періодів (1, 6, 12 год). Після інкубації протягом 12 год температуру води зменшували до 19±1°C і риб витримували протягом 3 і 12 год (нормотермія). Риб годували трубочником. Для дослідів чотирьох риб поміщали в акваріуми об'ємом 100 л з температурою води 19±1°C. Ця група риб була контролем. Для визначення впливу температури на риб воду було нагріто до 32±1°C.

Кафедра біохімії, Прикарпатський національний університет ім. В. Стефаника, Івано-Франківськ, вул. Шевченка, 57, 76025 факс: +38(03422) 31574, e-mail: lushchak@pu.if.ua

Назагал, для досліджень було використано 6 груп риб: група №1 — контроль, група №2 — 1 год стресу; група №3 — 6 год стресу; група №4 — 12 год стресу; група №5 — 3 год нормотермії; група №6 — 12 год нормотермії. Риб швидко забивали і відбирали білі м'язи.

Риб забивали трансспинальним методом і зразу ж використовували для аналізу потрібні тканини. Для визначення зв'язування ферменту наважки білих м'язів (0,2–0,5 г) гомогенізували (1:5 маса/об'єм) в охолоджену (4°C) розчині наступного складу (тут і далі

вказані кінцеві концентрації): 250 мМ сахарози, 20 мМ імідазол-гідрохлорид, 150 мМ КСІ і 20 мкМ інгібітора протеаз фенолметилсульфонілфториду (рН 7,0) [9]. Гомогенат центрифугували при 8000 g протягом 15 хв при 4 °С і відбирали супернатант. Цей препарат вважали вільною, або розчинною фракцією. Осад ресуспендували у попередньо вказаному буфері, але концентрацію хлориду калію збільшували до 500 мМ, після чого знову центрифугували у вказаному вище режимі. Отриманий супернатант відбирали і використовували для визначення активності зв'язаної форми ферменту.

Долю зв'язаних ферментів визначали за наступною формулою: відсоток зв'язаної форми = активність у «зв'язаній» фракції / (активність у «зв'язаній» + активність у «вільній» фракції) Ч 100 %.

За одну одиницю активності приймали кількість ферменту, яка каталізує утворення 1 мкмоль ІМФ за хвилину в стандартних умовах [10].

Концентрацію білка визначали методом Бредфорда [11]. Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін.

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «Мупова» [12]. Визначали середнє арифметичне $\bar{x}(M)$ та похибку середнього арифметичного — $S\bar{x}(m)$. Наведені на рисунку дані є середніми значеннями з похибкою, що дорівнює відхиленню цього середнього, а вказана кількість повторів (n) відповідає кількості використаних у досліді риб.

Результати та обговорення

У природі риби часто потрапляють у несприятливі умови, внаслідок чого в них еволюційно розвинулися захисні механізми, що включають різні процеси для їх виживання. Одним з таких механізмів є перерозподіл ферментів з вільної у зв'язану форму, яка, як вважають дослідники, менш чутлива до різних стресів. У наших експериментах витримування ротана протягом 1, 3 і 12 год. у воді з температурою 33 °С спричинювало достовірне збільшення активності зв'язаного ферменту з 33 % до 47, 48 і 42 %, відповідно (рис. 1).

При наступному поверненні риб у воду з температурою 19 °С (нормотермія) через 3 год ми спостерігали достовірне збільшення активності зв'язаного ферменту до 84 %. Проте, при нормотермії через 24 год рівень зв'язаного ферменту зменшився до 47 %. Хоча ми виявили деякі елементи специфічності змін розподілу між вільною та зв'язаною АМФ-дезаміназою з білих м'язів ротана під час нагрівання води і нормотермії, але все ж таки спостерігається певна закономірність. Короткострокове нагрівання води (1, 6 год) збільшує активність зв'язаної форми АМФ-дезамінази. Це, можливо, є важливим для того, щоб стабілізувати енергетичний заряд в клітині протягом всього стресу [7], який зменшується в процесі розвитку гіпоксії у тканинах риб [13]. Енергетичний заряд є важливим регулятором багатьох процесів у клітині, особливо тих, які проходять зі споживанням або утворенням енергії у вигляді АТФ.

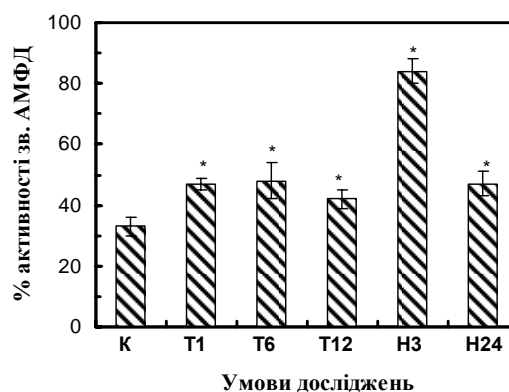


Рис. 1. Вплив температури (33 °С) на активність зв'язаної АМФ-дезамінази в білих м'язах ротана (n = 4).

«*» — достовірно відрізняється від контрольного значення (p<0,005). К — контроль; T1 — 1 год нагрівання; T6 — 6 год нагрівання; T12 — 12 год нагрівання; H3 — нормотермія 3 год; H24 — нормотермія 24 год.

Так, у м'язах міозинова АТФаза є головним споживачем АТФ та джерелом утворення АДФ, а через міокіназну реакцію призводить до продукування АМФ. Утворення АДФ та АМФ знижує енергетичний заряд. У цій ситуації вилучення дезаміназою АМФ з аденілатного пулу є саме тим механізмом, який стабілізує енергетичний заряд. Проте, це призводить до зниження загального вмісту аденілових нуклеотидів. Підвищення частки зв'язаної з міофібрилами АМФ-дезамінази збільшує ймовірність потрапляння продукованого АМФ (з АДФ через міокіназу) на активний центр ферменту [13]. Все це дозволяє нам припустити, що зв'язування АМФ-дезамінази з міофіламенами, чутливе до фізіологічного стану тварин, бере участь у точній регуляції метаболізму. Щоправда, на даний час практично нічого невідомо про механізми, які відповідають за такий перерозподіл. Можна лише припустити, що ними можуть бути зміна концентрацій будь-яких метаболітів, або ступеня фосфорилування ферменту чи структурного компонента, з яким він зв'язується [2].

Проте, є дані про те, що перехід АМФ-дезамінази з вільної у зв'язану форму, може модифікувати фермент, що, в свою чергу, зумовлює його інактивацию [10]. Але в наших дослідях такого явища не спостерігалось. Однією з причин цього явища може бути, наприклад, підвищена ефективність роботи системи енергопостачання в білих м'язах ротана — гліколізу і окисного фосфорилування.

Після повернення ротана до нормальних умов протягом 3 год після нагрівання в білих м'язах істотно збільшилась частка зв'язаної АМФ-дезамінази. Добре відомо, що активовані форми кисню (АФК), концентрації яких при короткочасній нормотермії досить високі, можуть інактивувати не тільки гліколітичні ферменти, ферменти циклу Кребса і компоненти електронно-транспортного ланцюга [14, 15], але й інші ферменти, включаючи і АМФ-дезаміназу [2]. Відомо, що зв'язування водорозчинних ферментів з клітинними компонентами може бути одним з ефективних механізмів, що захищають їх від інактивации, протеолізу і нагрівання [7, 16]. Проте, як цей механізм може бути залучений в регуляції активності АМФ-дезамінази на даний час невідомо.

Нормотермія протягом 24 год призводила до зниження активності зв'язаної АМФ-дезамінази відносно нормотермії протягом 3 год. Проте, в обох випадках активність зв'язаного ферменту була вищою, ніж в вихідному стані, що може пояснюватися адаптаційною відповіддю АМФ-дезамінази на цей стрес. Під час нагрівання та наступної нормотермії активність АМФ-дезамінази активно регулюється в білих м'язах ротана. Для цього є, як мінімум, два шляхи: а) зміни в концентраціях ортофосфату і органічних фосфатів, і б) просторово-часовий перерозподіл, який ми реєстрували як співвідношення між вільною і зв'язаною АМФ-дезаміназою.

Висновки

При збільшенні температури води до 33 °С в білих м'язах ротана спостерігається зростання частки зв'язаної форми АМФ-дезамінази. Це зростання можна пояснити тим, що у зв'язаному стані АМФ-дезаміназа менш чутлива до стресів на відміну від її вільної форми. Також можна припустити те, що перерозподіл АМФ-дезамінази між вільним та зв'язаним станами бере участь у стабілізації енергетичного заряду, який знижується в процесі розвитку гіпоксії у тканинах риб.

V. V. Husak, V. I. Lushchak

THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ON THE ACTIVITY AND REDISTRIBUTION BETWEEN FREE AND BOUND FORMS OF AMP DEAMINASE WITH WHITE MUSCLE OF *PERCCOTTUS GLENII* L.

S u m m a r y

At increasing water temperature to 33 C, the activity of bound form AMP deaminase increased in white muscle of *Perccottus glenii*. It observed after 1, 3 and 12 h under this stress conditions in white muscle of *P. glenii*. After the 3 h recovery we saw the increasing activity bound

form of AMP-deaminase. It can be account that in the bound form of AMP deaminase less sensible to stresses than its free form. It is also possible to assume that the redistribution between the free and bound forms of AMP deaminase takes part in stabilizing of energy charge which decrease in the process of hypoxia in tissues of fishes.

Precarpathian National University

В. В. Гусак, В. И. Луцак

**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ
МЕЖДУ СВОБОДНОЙ И СВЯЗАННОЙ АМФ-ДЕЗАМИНАЗОЙ БЕЛЫХ МЫШЦ
РОТАНА (*PERCCOTTUS GLENII L.*)**

А н н о т а ц и я

При увеличении температуры воды до 33° С в белых мышцах ротана наблюдается увеличение частицы связанной формы АМФ-дезаминазы. Это возростание можно объяснить тем, что в связанном состоянии АРФ-дезаминаза менее чувствительна к стрессам в отличии от ее свободной формы. Также можно предположить, что перераспределение АРФ-дезаминазы между свободными и связанными состояниями принимает участие в стабилизации энергетического заряда, который понижается в процессе развития гипоксии в тканях рыб.

1. *Lushchak V. I., Smirnova Y. D., Storey K. B.* // *Comp. Biochem. Physiol.* — 1998. — V. B119. — P. 611–618.
2. *Луцак В. И.* // *Биохимия.* — 1996. — Т. 61, №2. — С. 195–211.
3. *Lowenstein J. M.* // *Physiol. Rev.* — 1972. — V. 52. — P. 382–414.
4. *Schultz V., Lowenstein M.* // *J. Biol. Chem.* — 1976. — V. 251. — P. 485–492.
5. *Van Thillart den G., Van Waarde A., Muller H. J., Erkelens C., Addink A., Lugtenburg J.* // *Am. J. Physiol.* — 1989. — V. 256. — P. R922–R929.
6. *Mommsen T. P., Hochachka P. W.* // *Metabolism.* — 1988. — V. 37. — P. 552–556.
7. *Rundell K. W., Tullson P., Terjung R. L.* // *J. Appl. Physiol.* — 1993. — V. 74. — P. 2004–2006.
8. *Lushchak V. I., Storey K. B.* // *Int. J. Biochem.* — 1994. — V. 26, N 10/11. — P. 1265–1273.
9. *Clarke F. M., Shaw F. D., Morton D. J.* // *J. Biochem.* — 1980. — V. 186. — P. 105–109.
10. *Smiley K. L., Berry A. J., Suelter C. H.* // *J. Biol. Chem.* — 1967. — V. 242, N 10. — P. 2502–2506.
11. *Bradford M. M.* // *Anal. Biochem.* — 1976. — V. 72. — P. 289–292.
12. *Brooks S. P.* // *BioTechniques.* — 1992. — V. 13. — P. 906–911.
13. *Jorgensen J. B., Mustafa T.* // *Comp. Biochem. Physiol.* — 1980. — V. 67B. — P. 249–256.
14. *Луцак В. И.* // *Биохимия.* — 2007. — Т. 72, № 8. — С. 995–1017
15. *Szweda L. I., Stadtman E. R.* // *J. Biol. Chem.* — 1992. — V. 267, N 5. — P. 3096–3100.
16. *Луцак В. И.* // *Биохимия.* — 1992. — Т. 57, №8. — С. 1142–1154.