

ВЛИЯНИЕ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕИНАЗ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ КИШЕЧНИКА ЛЕЩА (*ABRAMIS BRAMA*) РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

Н.В. Ушакова¹, В.В. Кузьмина¹, О.П. Лупилов², В.А. Шептицкий²

Учреждение Российской академии наук Институт биологии внутренних вод

им. И.Д. Папанина РАН, п. Борок, Ярославская обл., Россия

Приднестровский государственный университет им. Т.Г. Шевченко,

г. Тирасполь, Молдова

e-mail: koryukaevan@ibiw.yaroslavl.ru

Введение

В последние годы особое внимание уделяется антропогенному воздействию на водные экосистемы. Выявлены факторы, влияющие на состояние гидробионтов (Toxicology of fishes, 2008). Поскольку энтеральная среда рыб является частью внешней среды (Thomas, 1964), можно ожидать, что усиление антропогенного пресса должно отражаться на состоянии ферментных систем пищеварительного тракта рыб. Действительно, в экспериментальных условиях было показано, что тяжелые металлы значительно снижают уровень активности гликозидаз и протеиназ слизистой оболочки кишечника рыб (Kuz'mina et al., 1999; Golovanova et al., 1999; Кузьмина, Ушакова, 2007а). Вместе с тем токсические вещества органической природы (дихлофос и нафталин) не всегда снижают активность пищеварительных гидролаз (Kuz'mina et al., 1999; Golovanova et al., 1999). Состояние ферментных систем пищеварительного тракта рыб, обитающих в различных участках Рыбинского водохранилища после аварии на Череповецком металлургическом комбинате, произошедшей в конце 1986 г. (Флеров, 1990), ранее не оценивалось. Вместе с тем данные, касающиеся активности пищеварительных ферментов, особенно протеиназ, важны для как оценки начальных этапов ассимиляции пищи отдельными особями, так и для оценки состояния кормовой базы биотопов и условий питания рыб. Цель работы состояла в изучении активности протеиназ слизистой оболочки кишечника леща, обитающего в различных участках Рыбинского водохранилища, в разной степени подверженных антропогенному прессу.

Материалы и методы

Работа проведена 2008–2009 гг. Объект исследования: лещ *Abramis brama* (L.) массой 889 ± 48 г. Материал отбирали в августе 2008 на 5 станциях, расположенных в разных плесах (Коприно и Волково – Волжский, Первомайка – Моложский, Мякса и Любец – Шекснинский плес). Кишечники рыб, отловленных донным тралом, сразу изымались и замораживались. В лаборатории после разморозки кишечника на холоду изымали содержимое. Специальным скребком снимали слизистую оболочку кишечника и индивидуально гомогенизировали ее при помощи стеклянного гомогенизатора, добавляя охлажденный до $2-4^{\circ}\text{C}$ раствор Рингера для холоднокровных животных (109 mM NaCl , 1.9 mM KCl , 1.1 mM CaCl_2) в соотношении 1:99. Определяли активность протеиназ слизистой оболочки кишечника при температуре 20°C и pH 7.4, в качестве субстрата использовали 1% раствор казеина (преимущественно трипсин КФ 3.4.21.1). Для изучения температурных характеристик протеиназ готовили суммарные пробы, включающие материал от 10 экз. рыб (7 экз. на станции Любец). Изучение температурных характеристик ферментов леща проводилось в широком диапазоне значений температуры ($0-70^{\circ}\text{C}$). Активность протеиназ определяли по приросту тирозина методом Ансона (Anson, 1938) в некоторой модификации. Инкубацию субстрата и ферментативно активного препарата проводили в течение 30 мин. Количество продуктов реакции (преимущественно тирозин) определяли при помощи фотоэлектроколориметра КФК-2 (длина волны 670 нм). Ферментативную активность определяли в 4-х повторностях для каждой точки с учетом фона и выражали в мкмоль/(г·мин). Энергию активации ($E_{\text{акт}}$) рассчитывали графическим методом Аррениуса. Данные обрабатывали статистически с использованием приложения EXCEL программы MS Office'XP. Достоверность результатов оценивали по Стьюденту при уровне значимости $p \leq 0.05$.

Результаты и обсуждение

Сопоставление активности протеиназ пищеварительного тракта леща, отловленного в разных районах Рыбинского водохранилища, показало, что уровень ферментативной активно-

сти у рыб из Шекснинского плеса достоверно отличается от такового трех других точек (рис. 1). Максимальные значения активности протеиназ отмечены у леща на ст. Любец (4.56 ± 0.13 мкмоль/(г·мин)), минимальные – на ст. Мякса (2.62 ± 0.12 мкмоль/(г·мин)), при этом активность на первой станции в 1.7 раза выше ($p < 0.001$), чем на второй. На станциях Моложского и Волжского плесов уровень активности протеиназ близок – 3.46 ± 0.28 , 3.78 ± 0.15 и 3.26 ± 0.09 мкмоль/(г·мин) на ст. Коприно, Волково и Первомайка соответственно. При этом максимальная амплитуда колебаний значений активности протеиназ у особей леща из одной и той же выборки зафиксирована на ст. Коприно (12 раз), минимальная – на ст. Любец (1.4 раза). На остальных станциях амплитуда колебаний значений активности протеиназ составляет 1.7–2.4 раза.

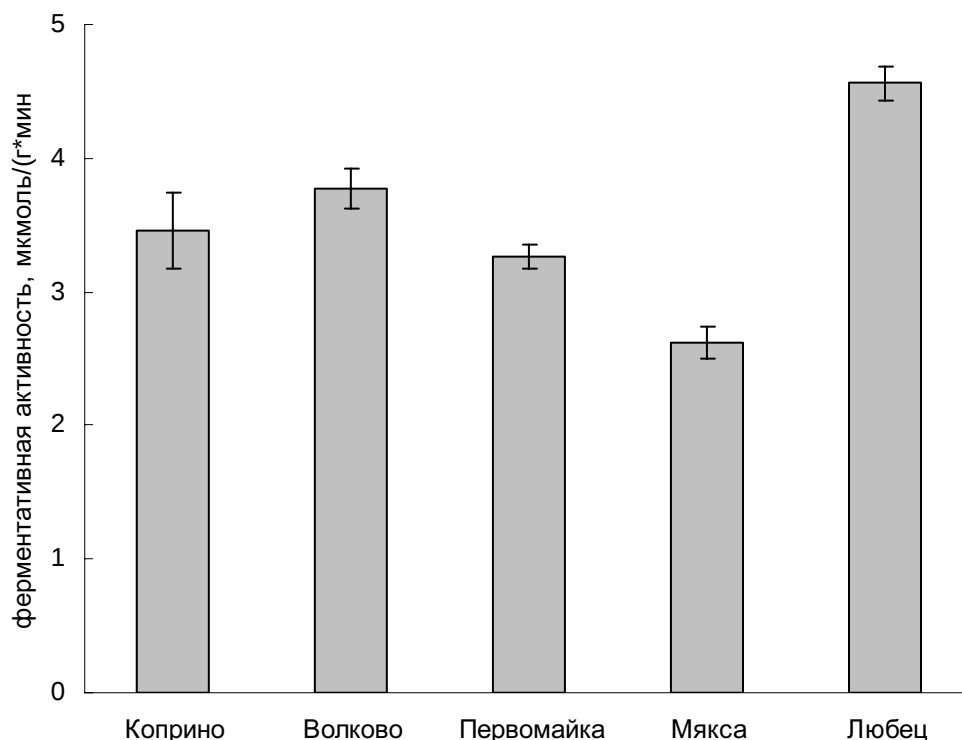


Рис. 1. Активность протеиназ слизистой оболочки кишечника леща из разных участков Рыбинского водохранилища.

Ранее исследование активности протеиназ пищеварительного тракта леща в разных районах Рыбинского водохранилища не проводилось. Вместе с тем, есть сведения об уровне протеолитической активности слизистой оболочки кишечника леща, отловленного в Волжском плесе Рыбинского водохранилища. Определения показали, что данные, полученные при исследовании леща из этого плеса (ст. Коприно), сопоставимы с результатами, полученными ранее для леща, отловленного в районе пос. Борок, находящегося вблизи ст. Коприно (Кузьмина и др., 2005; Кузьмина, Ушакова, 2007а). Однако, ранее было показано, что активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника леща Северошекснинского плеса выше по сравнению с таковым Южношекснинского и Волжского плесов (Кузьмина, 1983). Возможно, несколько большая активность протеиназ в наиболее загрязненном районе Рыбинского водохранилища (вблизи г. Череповец) связана с изменением состава кормовой базы, спектра питания и биохимического состава гидробионтов. Действительно, отмечено значительное влияние загрязняющих веществ, поступающих в Шекснинский плес Рыбинского водохранилища со стоками Череповецкого металлургического комбината, на видовой состав и численность гидробионтов. Количество видов коловраток уменьшилось от 30 до 5–7, разнообразие зоопланктона снизилось до 10–22% от общего списка видов, встречающихся выше города. Из планктона выпали обитатели чистых вод, такие как *Limnosed*, *Heterocope*, *Bythotrephes*, а также крупные босмины и дафнии. В составе бентоса появились олигохеты *Nais communis* и представители рода

Dero, увеличилась биомасса полихет *Hypania invalida*, вытесняющих личинки хирономид *Chironomus plumosus* (Ривьер и др., 2001). Изменение состава кормовой базы сопряжено с изменением содержания белка в организме гидробионтов. Ранее было показано, что концентрация белка у предпочитаемых объектов питания значительно варьирует – у представителей зоопланктона – 5.7, у хирономид – 7.2, у олигохеты – 10.4% сырой массы (Остроумова, 2001; Кузьмина, 2005). Кроме того, возможны различия в аминокислотном составе белков, как у разных видов гидробионтов, так и у особей одного и того же вида в зависимости от спектра питания и физиологического состояния, в частности уровня стрессирования (Кузьмина, 2005). Также известно о различиях в активности протеиназ в целом организме потенциальных объектов питания рыб. Так, у представителей зоопланктона активность протеиназ по казеину приблизительно в 7 раз, олигохет в 2 раза выше, чем в целом организме хирономид – 1.50 ± 0.04 , 0.48 ± 0.05 и 0.22 ± 0.01 мкмоль/(г·мин) соответственно (Кузьмина, Ушакова, 2007б).

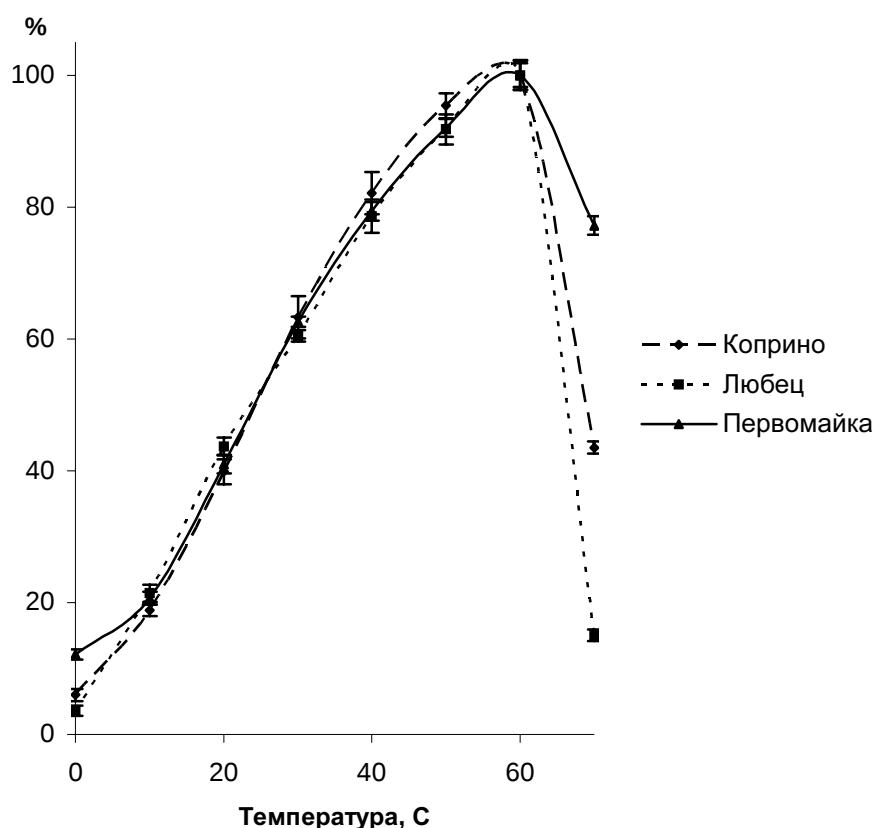


Рис. 2. Температурная зависимость протеиназ слюнной оболочки леща из разных участков Рыбинского водохранилища.

Поскольку ранее было показано, что токсические вещества влияют на температурные характеристики ферментов, представлялось целесообразным сопоставление температурной зависимости и энергии активации ($E_{\text{акт}}$) протеиназ слюнной оболочки кишечника леща из разных мест обитания. Температурная зависимость протеиназ кишечника леща, отловленного на ст. Любец, Первомайка и Коприно (рис. 2), близка описанным ранее для леща из Рыбинского, Горьковского и Саратовского водохранилищ (Кузьмина, 1990). Достоверные различия в уровне активности протеиназ леща из разных участков Рыбинского водохранилища установлены только при температурах 0 и 70°C. Так, при температуре 0°C активность ферментов рыб, отловленных на ст. Первомайка, в 1.9 раза ($p < 0.05$) выше, чем таковая леща со ст. Любец (0.62 ± 0.04 и 0.33 ± 0.07 мкмоль/(г·мин) соответственно). При этом относительная активность ферментов в первом случае в 3 раза ($p < 0.001$) выше, чем во втором. При температуре 70°C максимальный уровень относительной активности также характерен для ферментов леща со ст. Первомайка (77% от максимальной), несколько ниже – для рыб со ст. Коприно (44% от макси-

мальной), минимальный – для рыб со ст. Любец (15% от максимальной). При этом значения абсолютной активности протеиназ кишечника леща со ст. Любец в 2 раза ниже таковой протеиназ рыб со ст. Первомайка и Коприно (1.37 ± 0.08 , 3.96 ± 0.07 и 3.93 ± 0.08 мкмоль/(г·мин) соответственно). Полученные данные свидетельствуют о значительном сходстве кривых температурной зависимости протеиназ рыб из разных районов Рыбинского водохранилища и меньшей термостабильности ферментов леща, отловленного на ст. Любец. Последнее может указывать на то, что повреждающие факторы не оказывают значительного влияние на t° -функцию протеиназ и действуют лишь за пределами оптимальных значений температуры. Возможно, это связано с недостаточной концентрацией токсических веществ в пище рыб. Ранее было показано, что стрессирование формалином (18 мг/л) эмбрионов плотвы *Rutilus rutilus* на стадии активации яйца и образования бластодиска вызывает смещение оптимума щелочной фосфатазы от 50°C (в контроле) до 40°C, а также сужение зоны оптимальных значений температуры и уменьшение термостабильности ферментов (Кузьмина, Таликина, 1998). Аналогичные явления были обнаружены при воздействии в условиях *in vitro* биогенных металлов (цинк, медь) в концентрации 10 мг/л на активность протеиназ пищеварительного тракта и целого организма тюльки *Clupeonella cultriventris* (Кузьмина, Ушакова, 2008).

Сопоставление величин $E_{\text{акт}}$ протеиназ слизистой оболочки кишечника леща из разных участков Рыбинского водохранилища в диапазоне температур жизнедеятельности позволило выявить их существенные различия (табл. 1). Действительно, у леща, отловленного в наиболее чистом участке водохранилища (ст. Первомайка) не выявлен излом на графике Аррениуса, на более загрязненном участке (ст. Коприно) – один излом, на максимально загрязненном (ст. Любец) – два излома. При этом в зоне низких (0–10°C) и более высоких (10–20°C) температур величины $E_{\text{акт}}$ протеиназ леща, отловленного на ст. Первомайка, минимальны, на ст. Любец – максимальны. В зоне низких температур величина показателя различается в 3 раза, в зоне более высоких температур – лишь в 1.3 раза. Эти данные свидетельствуют о том, что у рыб, обитающих в Северошекснинском плесе эффективность гидролиза белковых компонентов пищи наиболее значительно ухудшается в зоне низких температур. Полученные результаты хорошо согласуются с имеющимися сведениями. Так, было показано, что величины $E_{\text{акт}}$ трипсинподобных протеиназ тюльки в присутствии металлов (цинк и медь в концентрации 10 мг/л) в зоне 0–10°C увеличиваются приблизительно в 2 раза, в зоне более высоких температур – в пределах 1.5 раз (Кузьмина, Ушакова, 2008).

Таблица 1

Энергия активации протеиназ слизистой оболочки кишечника леща Рыбинского водохранилища в диапазоне температур жизнедеятельности

Станция	Энергия активации, ккал/моль		Температура точки перегиба
	до точки перегиба	после точки перегиба	
Коприно	17.65	10.38	10
Первомайка	9.04	9.04	–
Любец	27.18	11.75/5.46	10 и 20

Выводы

Активность протеиназ слизистой оболочки кишечника леща, отловленного в разных участках Рыбинского водохранилища, различна. Уровень ферментативной активности максимален у рыб, обитающих в наиболее загрязненном участке водохранилища (ст. Любец). Кривые температурной зависимости протеиназ слизистой оболочки кишечника леща из разных мест обитания достаточно близки (температурный оптимум соответствует 60°C) и различаются лишь в зоне низких и постмаксимальных значений температур. Наиболее существенные различия выявлены при вычислении энергии активации протеиназ леща. Минимальные величины $E_{\text{акт}}$ во всем диапазоне температур жизнедеятельности обнаружены у рыб, обитающих в районе наименее загрязненной ст. Первомайка, максимальные – в районе наиболее загрязненной ст. Любец.

Литература

- Кузьмина В.В., Шишин М.М., Корюкаева Н.В., Наумова М.А., Ботяжова О.А., 2005. Влияние цинка и меди на активность протеиназ пищеварительного тракта у ряда видов пресноводных костистых рыб // Биол. внутр. вод. №4. С. 102–109.
- Кузьмина В.В., 1983. Активность α -амилазы в пищеварительном тракте и крови леща // Биол. внутр. вод. №59. 58–60.
- Кузьмина В.В., 1990. Влияние температуры на уровень общей протеолитической активности пищеварительного тракта некоторых видов пресноводных костистых рыб // Вопр. ихтиол. Т.30. №4. С. 668–677.
- Кузьмина В.В., Таликина М.Г., 1998. Влияние экстремальных воздействий в период раннего индивидуального развития на пищеварительные гидролазы сеголеток плотвы *Rutilus rutilus* // Вопр. ихтиол. Т.38. №4. С. 524–529.
- Кузьмина В.В., 2005. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. М.: Наука. 300 с.
- Кузьмина В.В., Ушакова Н.В., 2007а. Влияние температуры, pH и тяжелых металлов на активность протеиназ слизистой оболочки пищеварительного тракта рыб бенто- и планктофагов // Биол. внутр. вод. №4. С. 88–96.
- Кузьмина В.В., Ушакова Н.В., 2007б. Активность протеиназ у беспозвоночных животных – потенциальных объектов питания рыб. Влияние температуры, pH и тяжелых металлов // Ж. эвол. биохим. физиол. Т.43. №5. С. 404–409.
- Кузьмина В.В., Ушакова Н.В., 2008. Влияние тяжелых металлов (цинк, медь) на температурные характеристики протеиназ пищеварительного тракта тюльки *Clupeonella cultriventris* (Nordmann) // Матер. Всерос. конф.: «Организмы, популяции, экосистемы: проблемы и пути сохранения биоразнообразия». Вологда. С. 59–62.
- Остроумова И.Н., 2001. Биологические основы кормления рыб. СПб.: ГосНИОРХ. 372с.
- Ривьер И.К., Гусаков В.А., Жгарева Н.Н. и др., 2001. Изменение структурно-функциональных характеристик биологических сообществ. Загрязнение // Экологические проблемы Верхней Волги. / Ред. А.И. Копылов. Ярославль: ИБВВ РАН. С. 285–289.
- Флеров Б.А., 1990. Экологическая обстановка на Рыбинском водохранилище в результате аварии на очистных сооружениях г. Череповца в 1987 г. // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла а экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Рыбинск: ИБВВ. С. 3–11.
- Anson M., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J. Gen. Physiol. V. 22. P. 79–83.
- Golovanova I.L., Kuz'mina V.V., Gobzhelien T.E. et al., 1999. In vitro effects of cadmium and DDVP (Dichlorvos) on intestinal carbohydrase and protease activities in freshwater teleosts // Compar. Biochem. Physiol. V. 122C. P. 21–25.
- Kuz'mina V.V., Chuiko G. M., Pavlov D. F., 1999. Effect of DDVP, Naphtalene, and Cadmium on Intestinal Proteolytic Activity in Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) // Bull. Environ. Contam. Toxicol. V.62. № 2. P. 193–198.
- Thomas J.E., 1964. Organ systems in adaptation. The digestive system // Handbook of physiology. Washington. Sec. 4. Ch. 12. P. 193–214.
- Toxicology of fishes, 2008. / Eds. R.T. Di Giulio, D.E. Hinton. Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor and Francis Group. 1072 p.

INFLUENCE OF ANTHROPOGENIC IMPACT ON INTESTINAL MUCOSA PROTEINASE ACTIVITY IN BREAM *ABRAMIS BRAMA* FROM RYBINSK RESERVOIR

N.V. Ushakova¹, V.V. Kuzmina¹, O.P. Lupilov², V.A. Sheptitskiy²

¹ Papanin Institute for Biology of Inland Waters of Russian Academy of Science, Borok, Yaroslavl reg., Russia

² Shevchenko Pridnestrovskiy State University, Tiraspol, Moldova

It was shown, that intestinal mucosa proteinase activity in bream from different sites of Rybinsk reservoir is various. The level of enzyme activity is maximal in fish inhabiting in the most polluted site of this water basin (Lubetz). Curves of temperature dependence of intestinal mucosa proteinase in bream from different locations are close enough (temperature optimum corresponds to 60°C); the differences are found in a zone of low and postmaximal values of temperatures only. The most essential distinctions of temperature characteristics are revealed at calculation energy of activation of proteinase (E_{act}). Minimal values of E_{act} in all range of living temperatures are found in fish inhabiting in the least polluted area (Pervomaika), maximal – in the most polluted area (Lubetz). These data testify to significant influence of pollution on energy characteristics of the enzymes providing hydrolysis of protein components of fish food.