

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 597.554.3:577.15:574.64

### ВЛИЯНИЕ СВИНЦА НА АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ КИШЕЧНИКА РЫБ

И. Л. Голованова<sup>1</sup>, Г. А. Урванцева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН

<sup>2</sup>Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова

В экспериментах *in vitro* исследовано влияние ионов свинца Pb<sup>2+</sup> в концентрации 0,01–25 мг/л на активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника рыб, различающихся по типу питания, – планктофага синца *Abramis ballerus* (L.), бентофагов леща *Abramis brama* (L.), плотвы *Rutilus rutilus* (L.), белоглазки *Abramis sapa* (Pallas) и ихтиофагов судака *Sander lucioperca* (L.) и сома *Silurus glanis* L. Показана низкая чувствительность гликозидаз к действию ионов свинца Pb<sup>2+</sup> у исследованных видов рыб. Наибольший тормозящий эффект выявлен у леща, стимулирующий – у синца при концентрации ионов Pb<sup>2+</sup> 25 мг/л.

К л ю ч е в ы е с л о в а: гликозидазы, пищеварение, рыбы, тяжелые металлы, свинец.

#### I. L. Golovanova, G. A. Urvantseva. EFFECTS OF LEAD ON GLYCOSIDASE ACTIVITY IN INTESTINAL MUCOSA IN FISH

The effects of *in vitro* exposure to lead ions Pb<sup>2+</sup> at concentrations of 0.01–25 mg/l on the activity of intestinal mucosa glycosidases in fish with different feeding spectrum – planktophagous blue bream *Abramis ballerus* (L.), benthophagous bream *Abramis brama* (L.), roach *Rutilus rutilus* (L.), white-eye bream *Abramis sapa* (Pallas), ichthyophagous pikeperch *Sander lucioperca* (L.) and wels catfish *Silurus glanis* L. were investigated. Low sensitivity of glycosidases to the effect of lead Pb<sup>2+</sup> in the investigated fish species was shown. The highest inhibitory effect was observed in bream, the highest stimulatory effect – in blue bream at the 25 mg/l concentration of Pb<sup>2+</sup> ions.

К e y w o r d s: glycosidases, digestion, fish, heavy metals, lead.

#### Введение

В настоящее время практически все водоемы загрязнены тяжелыми металлами, которые в отличие от органических загрязнителей

не подвергаются биодegradации, а лишь перераспределяются между компонентами экосистем. Они поступают в водную среду в результате антропогенного загрязнения либо из природных источников (при вымывании гор-

ных пород, эрозии почвы) и находятся в растворимой (или ионной), коллоидной (органической и неорганической) или взвешенной форме. Значительное количество тяжелых металлов накапливается в грунтах [Флеров и др., 2000; Светашова, 2011], которые могут быть вторичным источником загрязнения. Форма существования металлов может меняться в зависимости от pH среды и наличия растворенных органических веществ [Линник, Набиванец, 1986; Светашова, 2011]. Наибольшей биологической активностью, как правило, обладают ионные формы металлов либо их липофильные комплексы.

Свинец, наряду с ртутью, кадмием, медью и цинком, входит в группу самых распространенных и опасных в экотоксикологическом отношении элементов. При этом Cu и Zn – необходимые микроэлементы, в то время как Pb, Cd и Hg такими не являются. Значения ПДК свинца для воды водоемов рыбохозяйственного назначения составляет 6 мкг/л [Перечень..., 1999]. Он аккумулируется в различных тканях гидробионтов, а его содержание в мышцах и печени пресноводных рыб из районов техногенного загрязнения может достигать 2–15 мг/кг [Перевозников, Богданова, 1999; Nduka et al., 2006; Askary Sary, Mohammadi, 2012]. Высокие концентрации свинца отмечены в донных отложениях водоемов и в кормовых объектах рыб-бентофагов (дрейссена) [Перевозников, Богданова, 1999; Светашова, 2011]. Попадая в организм рыб вместе с водой и пищей, он может оказывать прямое и опосредованное действие на активность ферментов пищеварительного тракта рыб. Углеводы являются важным энергетическим и пластическим компонентом пищи. Их содержание в кормовых объектах рыб планктофагов, бентофагов и особенно макрофитофагов значительно выше, чем у типичных ихтиофагов [Остроумова, 2001]. У рыб с более высоким содержанием углеводов в естественной пище отмечена и более высокая активность пищеварительных гликозидаз [Уголев, Кузьмина, 1993]. Ранее в экспериментах *in vitro* установлено изменение активности кишечных гликозидаз в присутствии ионов  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  у ряда видов пресноводных рыб, различающихся по типу питания [Golovanova et al., 1999; Филиппов, Голованова, 2010]. Однако действие ионов свинца  $Pb^{2+}$  на активность пищеварительных ферментов рыб практически не исследовано.

Цель данной работы – изучить *in vitro* влияние ионов свинца в концентрации 0,01–25 мг/л на активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника рыб, различающихся по типу питания.

## Материалы и методы

Объекты исследования – половозрелые особи шести видов рыб: планктофаг синец *Abramis ballerus* (L.), бентофаги лещ *Abramis brama* (L.), плотва *Rutilus rutilus* (L.), белоглазка *Abramis sapa* (Pallas), ихтиофаги судак *Sander lucioperca* (L.) и сом *Silurus glanis* L. Рыбы (по 8 экз. леща и плотвы, по 6 экз. белоглазки и синца, 5 экз. судака и 4 экз. сома) отловлены в весенний период 2012–2013 гг.: лещ (масса  $1200 \pm 130$  г), плотва ( $302 \pm 50$  г), судак ( $1400 \pm 60$  г), сом ( $12220 \pm 260$  г) – в Волжском плесе Рыбинского водохранилища (март–апрель), белоглазка ( $200 \pm 11$  г) и синец ( $222 \pm 26$  г) – в устье р. Ветлуги (первая декада мая). После поимки рыб обездвиживали, сразу извлекали кишечники, которые хранили при температуре  $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$  не более двух недель.

В лабораторных условиях кишечники очищали от жира и прилегающих тканей. Активность гликозидаз (мальтаза, амилолитическая активность) определяли в гомогенатах слизистой оболочки медиального отдела кишечника, предварительно освобожденного от химуса. При помощи стеклянного гомогенизатора готовили суммарные пробы (в состав которых входила слизистая от 4–8 экз. рыб одного вида), добавляя охлажденный до  $2-4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  раствор Рингера для холоднокровных животных (110 мМ NaCl, 1,9 мМ KCl, 13 мМ  $CaCl_2$ , pH 7,4) в соотношении 1:9. Затем исходные гомогенаты дополнительно разводили раствором Рингера в 2–10 раз. Растворы субстратов (растворимый крахмал в концентрации 18 г/л и мальтоза в концентрации 50 ммоль/л) готовили на таком же растворе Рингера. Для оценки влияния свинца на активность гликозидаз в пробирки приливали 0,25 мл гомогената и 0,25 мл раствора азотнокислой соли свинца  $Pb(NO_3)_2$  в концентрации 0,01; 0,1; 1; 5; 10 и 25 мг/л (в расчете на содержание ионов металла). В контроле вместо соли добавляли равное количество раствора Рингера. Содержимое пробирок инкубировали при температуре  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 7,4 в течение 1 часа при непрерывном перемешивании. Затем в каждую пробирку добавляли 0,5 мл субстрата и вновь инкубировали в течение 20–60 мин при тех же условиях. Выбор диапазона концентраций обусловлен значениями ПДК свинца и его содержанием в тканях рыб и кормовых объектов [Перевозников, Богданова, 1999; Перечень..., 1999; Светашова, 2011; Соболев, 2006].

Активность гликозидаз определяли на спектрофотометре Lambda 25 (Perkin&Elmer, США) при 505 и 670 нм. Для определения активности

мальтазы КФ 3.2.1.20 применяли набор для клинической биохимии «Фотоглюкоза» (ООО «Импакт», Россия). Амилолитическую активность (отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал, –  $\alpha$ -амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы) оценивали по приросту гексоз модифицированным методом Нельсона [Уголев и др., 1969]. Ферментативную активность определяли в пяти повторностях для каждой точки с учетом фона (количества конечных продуктов реакции в исходном гомогенате) и выражали в микромолях продуктов реакции, образующихся за 1 мин инкубации в расчете на 1 г влажной массы ткани (мкмоль/г-мин).

Результаты обработаны статистически с помощью программы Statistica 10.0 и представлены в виде средних и их ошибок ( $M \pm m$ ). Сравнительный анализ полученных данных проводили с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса. Порог доверительной вероятности при оценке достоверности различий принят равным 0,95.

## Результаты и обсуждение

Уровень активности гликозидаз в слизистой оболочке кишечника леща и плотвы в 1,5–6,0 раза выше, чем у судака и сома (табл.). Еще более высокая активность гликозидаз у синца и белоглазки обусловлена не столько видовыми особенностями, сколько наличием пищи (в кишечнике присутствовал химус), в то время как у других исследованных видов рыб кишечника были пусты. Это предположение хорошо согласуется с представлениями о стимулирующем действии пищевых субстратов на активность пищеварительных ферментов [Уголев, 1972].

Амилолитическая активность у леща снижается на 18 и 27 % от контроля в присутствии ионов свинца  $Pb^{2+}$  в концентрации 10 и 25 мг/л. У других исследованных видов достоверных эффектов не обнаружено. Изменение активности мальтазы отмечено лишь при наибольших концентрациях металла: снижение на 29 и 30 % у леща, повышение на 23 и 73 % у синца и на 26 % от контроля у судака.

Ранее было показано, что амилолитическая активность в гомогенатах слизистой оболочки кишечника у десяти видов рыб Рыбинского водохранилища, в том числе леща, плотвы, синца и судака, отловленных в зимний период, практически не изменяется при *in vitro* действии ионов кадмия  $Cd^{2+}$  в концентрации 0,1–25 мг/л [Golovanova et al., 1999]. Снижение ферментативной активности на 22 % отмечено лишь у налима при концентрации ионов  $Cd^{2+}$  25 мг/л. При более высокой концентрации ионов  $Cd^{2+}$  50 мг/л амилолитическая активность снижалась у налима, карася и карпа на 23, 26 и 29 % соответственно. Активность собственно мембранного фермента сахаразы достоверно снижалась на 33 % от контроля лишь у планктофага синца при концентрации ионов  $Cd^{2+}$  50 мг/л [Golovanova et al., 1999].

Сравнительный анализ действия ионов свинца  $Pb^{2+}$  и кадмия  $Cd^{2+}$  на активность пищеварительных гликозидаз слизистой оболочки кишечника пресноводных рыб позволяет предположить большую чувствительность ферментов рыб бенто- и планктофагов по сравнению с типичными ихтиофагами к действию неэссенциальных металлов. Гликозидазы плотвы более устойчивы к действию свинца, по сравнению с лещом, что может быть связано с большим количеством тяжелых металлов

Активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника рыб в присутствии ионов свинца  $Pb^{2+}$

Концентрация ионов $Pb^{2+}$ , мг/л	Вид рыб					
	Лещ	Плотва	Судак	Сом	Белоглазка	Синец
Амилолитическая активность, мкмоль/г-мин						
Контроль (0)	1,55 ± 0,01	2,75 ± 0,12	1,01 ± 0,02	0,46 ± 0,02	16,96 ± 0,66	6,29 ± 0,25
0,01	1,40 ± 0,02	3,47 ± 0,06	0,99 ± 0,01	0,47 ± 0,03	16,32 ± 0,64	5,23 ± 0,22
0,1	1,40 ± 0,02	2,48 ± 0,03	1,07 ± 0,02	0,52 ± 0,03	15,36 ± 0,74	5,97 ± 0,11
1	1,35 ± 0,02	2,80 ± 0,04	0,98 ± 0,01	0,52 ± 0,03	18,12 ± 0,56	6,35 ± 0,10
5	1,44 ± 0,02	2,43 ± 0,05	1,05 ± 0,02	0,51 ± 0,02	18,61 ± 0,46	6,13 ± 0,24
10	1,27 ± 0,01**	2,45 ± 0,03	0,92 ± 0,01	0,52 ± 0,03	21,01 ± 0,26	6,24 ± 0,23
25	1,13 ± 0,02***	2,72 ± 0,07	0,86 ± 0,01	0,54 ± 0,03	20,85 ± 0,24	6,13 ± 0,25
Активность мальтазы, мкмоль/г-мин						
Контроль (0)	3,26 ± 0,09	6,11 ± 0,20	2,23 ± 0,02	0,54 ± 0,04	23,26 ± 0,10	10,51 ± 0,23
0,01	3,22 ± 0,13	6,13 ± 0,22	2,22 ± 0,02	0,61 ± 0,05	22,40 ± 0,13	11,42 ± 0,49
0,1	3,23 ± 0,07	6,74 ± 0,12	2,20 ± 0,03	0,65 ± 0,04	23,28 ± 0,32	11,84 ± 0,14
1	2,75 ± 0,10	5,95 ± 0,24	2,22 ± 0,02	0,56 ± 0,02	24,30 ± 0,24	12,12 ± 0,22
5	2,29 ± 0,03	6,31 ± 0,26	2,35 ± 0,03	0,59 ± 0,03	24,55 ± 0,51	12,41 ± 0,30**
10	2,28 ± 0,02*	7,08 ± 0,15	2,51 ± 0,01	0,53 ± 0,02	24,51 ± 0,27	12,89 ± 0,15*
25	2,31 ± 0,03*	6,37 ± 0,13	2,80 ± 0,01*	0,64 ± 0,03	24,61 ± 0,44	18,17 ± 0,50***

Примечание. Приведены средние значения показателей и их ошибки ( $M \pm m$ ); различия показателей по сравнению с контролем статистически достоверны: \* – при  $p < 0,05$ ; \*\* – при  $p < 0,01$ ; \*\*\* – при  $p < 0,001$ .

в ее естественной пище. Действительно, в питании пойменно-придонной экологической группы плотвы преобладает дрейссена, в тканях которой зарегистрирован высокий уровень содержания тяжелых металлов, в том числе и свинца [Соболев, 2006; Светашова, 2011]. Повышение активности мальтазы у синца и судака в присутствии свинца объяснить труднее. Разнонаправленные эффекты ионов свинца  $Pb^{2+}$  на активность одноименных ферментов могут быть обусловлены не только типом питания рыб и биохимическим составом пищи, но и разным функциональным состоянием пищеварительной системы (сытость–голод), как это было показано на примере действия ионов  $Cd^{2+}$  на активность гликозидаз у леща [Golovanova et al., 1994, 1999].

Общее неспецифическое действие тяжелых металлов заключается в блокировании ими различных биохимических реакций посредством связывания функциональных –SH групп ферментов или вытеснения микроэлементов из активных центров. Поскольку существует несколько изоформ  $\alpha$ -амилазы, глюкоамилазы и мальтазы, нельзя исключить и молекулярную разнокачественность ферментов рыб разных экологических групп. Сила и направленность эффектов могут быть обусловлены разным влиянием свинца на панкреатические и собственно кишечные ферменты, разным содержанием свинца в пище [Светашова, 2011], а также уровнем его накопления в тканях, который отличается у рыб разных видов [Nduka et al., 2006; Alipour et al., 2013] и зависит от сезона года [Coulibaly et al., 2012]. Поскольку изменения физиолого-биохимических показателей могут свидетельствовать о нарушениях в обмене веществ задолго до появления видимых отклонений от нормы, изучение чувствительности ферментов к действию токсических веществ необходимо для ранней диагностики состояния здоровья рыб.

## Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о низкой чувствительности гликозидаз (мальтазы и амилолитической активности) слизистой оболочки кишечника исследованных видов рыб, различающихся по типу питания, к действию *in vitro* ионов свинца  $Pb^{2+}$  в концентрации 0,01–25 мг/л. Достоверные эффекты выявлены лишь при самых высоких концентрациях металла: наибольший тормозящий эффект – у леща, стимулирующий – у синца. Гликозидазы плотвы, сома и белоглазки нечувствительны к действию ионов свинца  $Pb^{2+}$  *in vitro*.

## Литература

- Линник Л. П., Набиванец Б. И. Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах. Л.: Гидрометеоиздат, 1986. 270 с.
- Остроумова И. Н. Биологические основы кормления рыб. 2001. СПб.: ГосНИОРХ, 372 с.
- Перевозников М. А., Богданова Е. А. Тяжелые металлы в пресноводных экосистемах. СПб.: Гос. науч.-исслед. ин-т озер. и реч. хоз-ва. 1999. 228 с.
- Перечень рыбохозяйственных нормативов: предельно допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. М.: Всерос. науч.-исслед. ин-т рыб. хоз-ва и океанографии. 1999. 304 с.
- Светашова Е. С. К вопросу накопления тяжелых металлов в водных экосистемах // Экологические проблемы пресноводных рыбохозяйственных водоемов России. Всерос. науч. конф. с междунар. участием. Казань. 2011. С. 371–375.
- Соболев К. Д. Загрязнение тяжелыми металлами естественных и искусственных кормов и его влияние на рыб в условиях сбросных теплых вод // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2006. 24 с.
- Уголев А. М., Кузьмина В. В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеоиздат, 1993. 238 с.
- Уголев А. М. Мембранное пищеварение. Поли-субстратные процессы, организация и регуляция. Л.: Наука, 1972. 358 с.
- Уголев А. М., Иезуитова Н. Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // Исследование пищеварительного аппарата у человека. Л.: Наука, 1969. С. 192–196.
- Филиппов А. А., Голованова И. Л. Раздельное и совместное влияние меди и цинка *in vitro* на активность карбогидраз кишечника пресноводных костистых рыб // Биология внутр. вод. 2010. № 1. С. 104–109.
- Флеров Б. А., Томилина И. И., Кливленд Л. и др. Комплексная оценка состояния донных отложений Рыбинского водохранилища // Биология внутр. вод. 2000. № 2. С. 148–155.
- Alipour H., Pourkhabbaz A., Hassanpour M. Assessing of heavy metal concentrations in the tissue of *Rutilus rutilus caspicus* and *Neogobiusgorlap* from Miankaleh international wetland // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2013. Vol. 91, N 5. P. 517–521.
- Askary Sary A., Mohammadi M. Lead bioaccumulation and toxicity in tissue of economically fish species from river and marine water // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2012. Vol. 89, N 1. P. 82–85.
- Coulibaly S., Atse B. C., Koffi K. M., Sylla S., Konan K. J., Kouassi N. J. Seasonal accumulation of some heavy metals in water, sediment and tissue of black-chinned tilapia *Sarotherodon metanothereon* from Biétri Bay in Ebrié Lagoon, Ivory Coast // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2012. Vol. 88, N 4. P. 571–576.
- Golovanova I. L., Chuiko G. M., Pavlov D. F. Effects of cadmium, Naphthalene and DDVP on Gut Carbohydrases Activity in Bream (*Abramis brama* L.) and Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1994. Vol. 52, N 3. P. 338–345.

*Golovanova I. L., Kuz'mina V. V., Gobzhel'ian T. E., Pavlov D. F., Chuiko G. M. In vitro effects of cadmium and DDVP (Dichlorvos) on intestinal carbohydrase and protease activities in freshwater teleost // Comp. Biochem. Physiol. 1999. Vol. 122 C, N 1. P. 21–25.*

*Nduka J. K. C., Constance E., Obiakor E. Selective bioaccumulation of metals by different parts of some fish species from crude oil polluted water// Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2006. Vol. 77, N 5. P. 846–853.*

#### **СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:**

**Голованова Ирина Леонидовна**

главный научный сотрудник  
ИБВВ им. И. Д. Папанина РАН  
Борок, Ярославская обл.,  
Некоузский р-н, Россия, 152742  
эл. почта: golovanova5353@mail.ru  
тел.: (485) 4724484

**Урванцева Галина Александровна**

доцент  
Ярославский государственный  
университет им. П. Г. Демидова  
ул. Советская, д. 14, г. Ярославль, Россия, 150000  
эл. почта: urvga@mail.ru  
тел.: (485) 2474617

**Golovanova, Irina**

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters,  
Russian Academy of Sciences  
152742 Borok, Yaroslavl Region, Russia  
e-mail: golovanova5353@mail.ru  
tel.: (485) 4724484

**Urvantseva, Galina**

P. G. Demidov Yaroslavl State University  
14 Sovetskaya St., 150000 Yaroslavl, Russia  
e-mail: urvga@mail.ru  
tel.: (485) 2474617