

УДК [597-143.4:577.152.3]:556.551.32
ББК 28.693.324:28.072.534

Д. А. Бедняков, А. Н. Невалянский, С. Г. Коростелёв

**СОВМЕСТНОЕ ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И ИОНОВ МЕТАЛЛОВ
НА УРОВЕНЬ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ
СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ КИШЕЧНИКА
У РЫБ СЕМЕЙСТВА ACIPENSERIDAE**

D. A. Bednyakov, A. N. Nevalenny, S. G. Korostylev

**COMBINED INFLUENCE OF TEMPERATURE AND METAL IONS
ON THE LEVEL OF ACTIVITY OF ALKALINE PHOSPHATASE
OF INTESTINAL MUCOSA OF ACIPENSERIDAE**

Показано совместное влияние ионов двухвалентных металлов (Mn, Fe, Co, Ni, Cu и Zn) и температуры на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки у рыб сем. *Acipenseridae*. Показана зависимость ответной реакции фермента на действие ионов металлов в соответствии с их положением в периодической таблице химических элементов. Данная зависимость сохраняется и при изменении температуры инкубации: только при низких значениях температуры максимален активирующий эффект металлов, находящихся в начале периода, при высоких значениях температуры максимален ингибирующий эффект металлов, находящихся в конце периода.

Ключевые слова: осетровые, щелочная фосфатаза, кишечный эпителий, ионы металлов, температура.

The combined influence of divalent metal ions (Mn, Fe, Co, Ni, Cu and Zn) and temperature on the level of alkaline phosphatase activity of the mucous membrane of the *Acipenseridae* is shown. The dependence of the response of the enzyme to the action of metal ions according to their position in the periodic table of chemical elements is presented. This dependence is kept during the change of incubation temperature as well, but only at low temperatures the activating effect of metals is maximum in the early period at high temperatures the inhibitory effects of metals is maximum at the end of the period.

Key words: sturgeon, alkaline phosphatase, intestinal epithelium, metal ions, temperature.

Введение

В настоящее время выявлены регуляторные свойства для большинства ферментов, участвующих в процессах мембранного пищеварения; при этом данные свойства описаны не только для высших позвоночных животных [1, 2], но и для рыб [3–5], а также для беспозвоночных животных [6]. Отмечена широкая вариабельность регуляторных свойств ферментов как у представителей разных классов животных, так и среди видов одной систематической группы. На основании этих данных А. М. Уголевым [1] было высказано предположение о том, что изменение активности пищеварительных ферментов в присутствии веществ-модификаторов является универсальным свойством, которое присуще различным представителям животного мира.

Ранее были получены данные, свидетельствующие о достоверных изменениях уровней активности многих ферментов, в том числе и пищеварительных, под влиянием ионов металлов [4], что позволяет отнести их к группе веществ-модификаторов. При исследовании влияния различных модификаторов на ферментные системы рыб было показано, что характер влияния модификатора на фермент во многом может зависеть от температуры инкубации [3, 7]. Так, в частности, у щуки трибутирин при низких значениях температуры вызывает незначительное увеличение уровня активности ферментов, а у леща и плотвы при температуре 0 и 20 °С приводит к статистически достоверному торможению ферментативной активности [3]. В более поздних работах было отмечено, что присутствие в инкубационной среде металлов может существенно изменять характеристика ферментов. Так, установлено, что при низкой температуре действие ионов тяжелых металлов, как правило, усиливается [8–10]. В связи с этим мы провели исследования совместного влияния ионов металлов и температуры на уровень активности щелочной фосфатазы (ЩФ) слизистой оболочки кишечника рыб сем. *Acipenseridae*. Выбор фермента был обусловлен тем, что ЩФ является металлозависимым ферментом и содержит в своем строении прочно связанные ионы металлов, которые могут замещаться друг на друга [11].

Материал и методика исследований

В работе были исследованы годовики белуги (*Huso huso*), русского осетра (*Acipenser güldenstädti*) и севрюги (*Acipenser stellatus*), выращенные в искусственных условиях. Было исследовано по 12 экземпляров каждого вида.

Пойманных рыб в специальных ёмкостях течение 1–2 часа доставляли в лабораторию, где у них на холоде изымали желудочно-кишечный тракт и специальным скребком снимали слизистую оболочку кишечника. Гомогенаты готовили при помощи гомогенизатора (лабораторный гомогенизатор *Daihan Scientiic*), добавляя охлажденный до 2–4 °С раствор Рингера для холоднокровных животных (109 мМ NaCl, 1,9 мМ KCl, 1,1 мМ CaCl₂, 1,2 мМ NaHCO₃) в соотношении 1 : 49. Уровень активности ЩФ (КФ 3.1.3.1) определяли по степени гидролиза *n*-нитрофенилфосфата Na [12].

В качестве источников ионов металлов использовали соответствующие серноокислые соли (MnSO₄, FeSO₄, CoSO₄, NiSO₄, CuSO₄, ZnSO₄). Растворы этих солей добавляли в ферментативно активный препарат и субстрат в количестве, необходимом для создания в этих средах концентрации соответствующего иона в 10 мг/л. Инкубацию производили при температуре 0, 25 и 40 °С.

Статистическую обработку данных проводили по общепринятым методикам [13]. Данные обрабатывали с использованием приложения EXCEL программы MS Office для WINDOWS XP.

Результаты исследования и их обсуждение

На рис. 1 представлены данные по совместному влиянию температуры и ионов двухвалентных металлов на уровень активности ЩФ слизистой оболочки кишечника белуги. Как видно из рис. 1, Mn²⁺, Fe²⁺ и Co²⁺ при температуре инкубации 0 °С вызывают статистически достоверное ($p < 0,001$) увеличение уровня активности ЩФ – $0,60 \pm 0,01$, $0,62 \pm 0,01$ и $0,50 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин) соответственно. Контрольное значение уровня активности фермента составило $0,34 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин). Наличие Cu²⁺ в инкубационной среде привело к достоверному ($p < 0,01$) ингибированию уровня активности ЩФ до $0,28 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин). Ni²⁺ и Zn²⁺ не вызвали изменений в уровне активности фермента при температуре инкубации 0 °С. Присутствие в инкубационной среде Mn²⁺, Fe²⁺ и Co²⁺ при температуре 25 °С также приводит к увеличению уровня активности ЩФ, однако не к такому мощному, как при более низкой температуре. Наличие Ni²⁺, Cu²⁺ и Zn²⁺ в инкубационной среде вызывает достоверное ($p < 0,05$) уменьшение ферментативной активности. Так, уровень активности ЩФ составил $0,84 \pm 0,01$, $0,94 \pm 0,01$, $0,84 \pm 0,01$, $0,62 \pm 0,01$, $0,53 \pm 0,01$ и $0,67 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин) в присутствии Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ и Zn²⁺ соответственно, против $0,69 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин) в контроле. При увеличении температуры инкубации до 40 °С тенденция к воздействию ионов металлов на уровень активности ЩФ слизистой оболочки кишечника белуги сохраняется, однако становится менее выраженной. Так, в частности, в присутствии Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ и Zn²⁺ уровень активности фермента составил $1,62 \pm 0,01$, $1,68 \pm 0,01$, $1,75 \pm 0,01$, $1,36 \pm 0,01$, $1,12 \pm 0,01$ и $1,36 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин) соответственно, против $1,42 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин) в контроле.

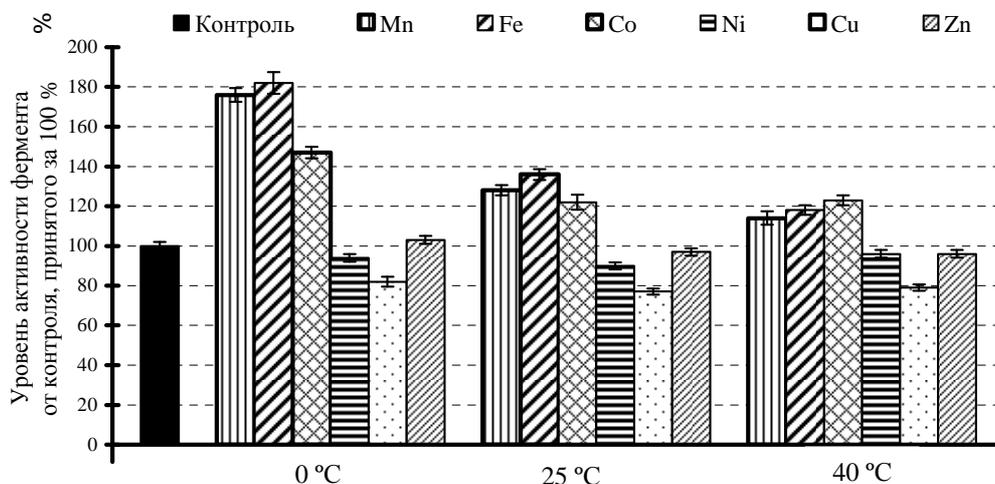


Рис. 1. Совместное влияние ионов металлов в концентрации 10 мг/л и температуры на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника белуги

Данные по исследованию совместного влияния температуры и ионов двухвалентных металлов на уровень активности ЩФ слизистой оболочки кишечника *русского осетра* представлены на рис. 2. Из рис. 2 видно, что при температуре инкубации 0 °С наличие ионов Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} и Zn^{2+} вызывает увеличение уровня активности ЩФ до $0,57 \pm 0,01$, $0,63 \pm 0,01$, $0,54 \pm 0,01$ и $0,43 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин) соответственно, против $0,40 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин) в контроле. Присутствие Ni^{2+} и Cu^{2+} в инкубационной среде достоверно ($p < 0,05$) ингибирует уровень активности ЩФ до $0,37 \pm 0,01$ и $0,33 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин) соответственно. При температуре инкубации 25 °С ионы Mn^{2+} , Fe^{2+} и Co^{2+} вызывают достоверное ($p < 0,01$) увеличение уровня активности ЩФ до $0,78 \pm 0,01$, $0,89 \pm 0,01$ и $0,81 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин) соответственно. Ni^{2+} и Cu^{2+} вызывает достоверное ($p < 0,05$) уменьшение уровня активности фермента до $0,61 \pm 0,01$ и $0,52 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин) соответственно, против $0,66 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин) в контроле. Присутствие Zn^{2+} в инкубационной среде при температуре 25 °С не вызывает изменений в уровне активности ЩФ. Увеличение температуры инкубации до 40 °С не повлияло на характер влияния ионов металлов на уровень активности ЩФ, который составил $1,46 \pm 0,01$, $1,50 \pm 0,01$, $1,49 \pm 0,01$, $1,26 \pm 0,01$, $1,03 \pm 0,01$ и $1,29 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин) в присутствии Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} соответственно. Контрольное значение уровня активности фермента составило $1,32 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин).

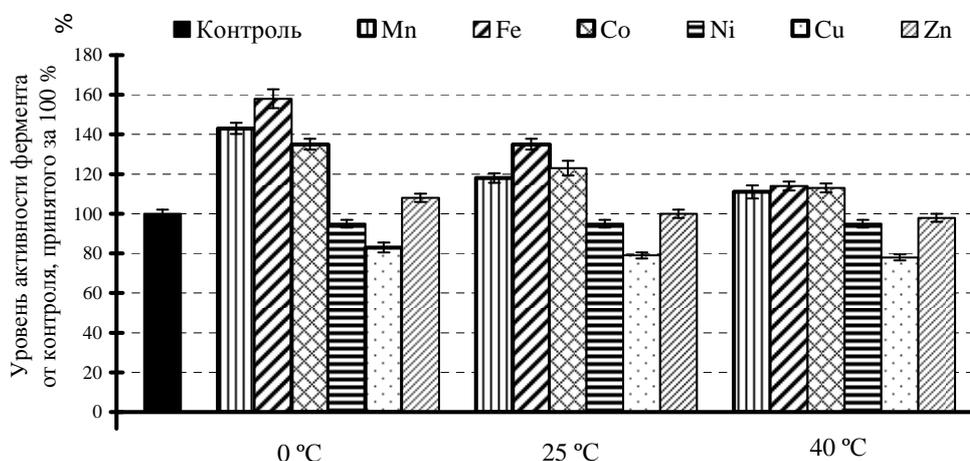


Рис. 2. Совместное влияние ионов металлов в концентрации 10 мг/л и температуры на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника русского осетра

На рис. 3 представлены данные по совместному влиянию температуры и ионов двухвалентных металлов на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника *севрюги*. Из рис. 3 видно, что при низкой температуре инкубации (0 °С) происходит статистически достоверное ($p < 0,001$) увеличение уровня активности ЩФ в присутствии Mn^{2+} , Fe^{2+} и Co^{2+} и достоверное ($p < 0,05$) ингибирование при наличии Ni^{2+} и Cu^{2+} . Так, в присутствии этих ионов уровень активности фермента составил $0,51 \pm 0,01$, $0,67 \pm 0,01$, $0,57 \pm 0,01$, $0,36 \pm 0,01$ и $0,31 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин) соответственно. В контроле уровень активности ЩФ составил $0,39 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин). Присутствие Zn^{2+} при всех исследованных нами значениях температуры не приводит к изменениям в уровне активности ЩФ слизистой оболочки кишечника севрюги. При увеличении температуры инкубации до 25 °С Mn^{2+} , Fe^{2+} и Co^{2+} также вызывают достоверное ($p < 0,01$) увеличение уровня активности ЩФ (но данный эффект выражен слабее), а Ni^{2+} и Cu^{2+} оказывают ингибирующий эффект на ЩФ. Так, уровень активности фермента составил $0,82 \pm 0,01$, $0,94 \pm 0,01$, $0,87 \pm 0,01$, $0,62 \pm 0,01$ и $0,53 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин) в присутствии Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Cu^{2+} соответственно. В контроле значение уровня активности ЩФ составило $0,68 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин). При температуре инкубации 40 °С характер воздействия ионов металлов на активность ЩФ практически не изменился, за тем исключением, что Ni^{2+} перестал оказывать достоверное влияние на фермент.

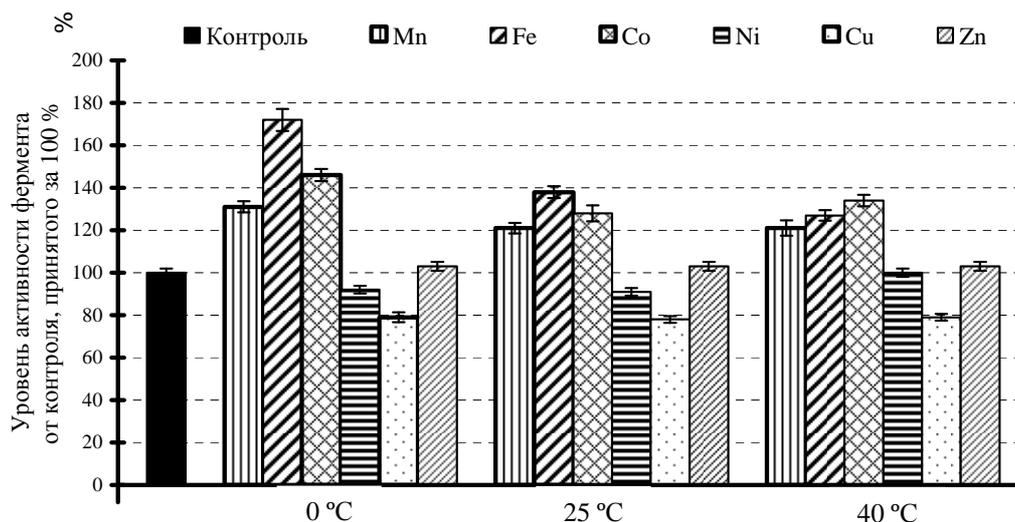


Рис. 3. Совместное влияние ионов металлов в концентрации 10 мг/л и температуры на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника севрюги

Уровень активности ЩФ составил $1,44 \pm 0,01$, $1,51 \pm 0,01$, $1,59 \pm 0,01$ и $0,84 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин) в присутствии Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} и Cu^{2+} соответственно, против $1,19 \pm 0,01$ мкмоль/(г · мин) в контроле.

Заключение

Полученные нами данные демонстрируют, что ионы металлов могут значительно изменять уровень активности ЩФ слизистой оболочки кишечника рыб, при этом на степень воздействия иона металла оказывает существенное влияние температура. Так, при низких значениях температуры (0 °C) отмечается более выраженный активирующий эффект Mn^{2+} , Fe^{2+} и Co^{2+} , эффекты Ni^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} при увеличении температуры практически не изменяются. В случае взаимодействия Ni^{2+} и Zn^{2+} с ЩФ при увеличении температуры может наблюдаться нивелирование эффекта, который оказывает ион металла на фермент. Так, в частности, при температуре инкубации 0 и 25 °C Ni^{2+} вызывает ингибирование ЩФ слизистой оболочки кишечника белуги в среднем на 8 %, увеличение температуры инкубации до 40 °C Ni^{2+} не приводит к достоверным изменениям в уровне активности фермента. Zn^{2+} при низких (0 °C) значениях температуры инкубации вызывает увеличение уровня активности ЩФ слизистой оболочки кишечника русского осетра на 8 %, а при увеличении температуры инкубации (до 25 и 40 °C) не наблюдается достоверных изменений в уровне активности фермента.

Возможный механизм взаимодействия металла с молекулой фермента, вероятно, заключается в связывании иона металла со специальной контактной площадкой и с замещением металлокомпонента на металл, близкий по атомному строению [14]. Изменение температуры, в свою очередь, изменяет скорость движения молекул и, следовательно, скорость замещения металлокомпонента в молекуле фермента.

Ранее нами была описана зависимость ответной реакции ферментов, в том числе и ЩФ, на действие ионов металлов в соответствии с их положением в периодической таблице химических элементов Д. И. Менделеева [4, 10, 15, 16]. При изменении температуры инкубации данная зависимость сохраняется, но следует отметить, что при низких значениях температуры максимален активирующий эффект металлов, находящихся в начале периода, а при высоких значениях – ингибирующий эффект металлов, находящихся в конце периода.

Приведенные результаты демонстрируют регуляторную функцию ионов металлов, выступающих в качестве модификаторов ЩФ слизистой оболочки кишечника рыб сем. *Acipenseridae*. Отметим, что установлены как общие для всех исследованных нами видов закономерности взаимодействия модификатора с ферментом, так и некоторые видоспецифичные закономерности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Уголев А. М. Мембранное пищеварение и процессы усвоения пищи в мире животных // Журнал эволюц. биохимии и физиологии. – 1972. – Т. 8, № 3. – С. 269–278.
2. Кушак Р. И. Пищеварительно-транспортная система энтероцитов. – Рига: Зинанте, 1983. – 304 с.
3. Уголев А. М., Кузьмина В. В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. – СПб.: Гидрометеоиздат, 1993. – 283 с.
4. Невалянный А. Н., Туктаров А. В., Бедняков Д. А. Функциональная организация и адаптивная регуляция процессов пищеварения у рыб. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2003. – 152 с.
5. Влияние модификаторов на пищеварительные гидролазы у рыб разных систематических групп / А. Н. Невалянный, Д. А. Бедняков, В. Ю. Новинский, С. Г. Коростелёв // Вопр. ихтиологии. – 2011. – Т. 51, № 3. – С. 1–6.
6. Уголев А. М., Митюшова П. М., Егорова В. В. Регуляторные свойства пищеварительных ферментов и биология многосубстратных пищеварительных процессов // Журнал эволюц. биохимии и физиологии. – 1977. – Т. 13. – С. 589–599.
7. Кузьмина В. В. Регуляторные свойства ферментов, обеспечивающих процессы мембранного пищеварения у рыб // Журнал общей биологии. – 1987. – Т. 48, № 6. – С. 828–838.
8. Голованова И. Л. Влияние природных и антропогенных факторов на гидролиз углеводов у рыб и объектов их питания: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – СПб., 2006. – 40 с.
9. Кузьмина В. В. Физиология питания рыб. Влияние внешних и внутренних факторов / Ин-т биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина. – Борок, 2008. – 276 с.
10. Бедняков Д. А., Невалянный А. Н. Модификационное регулирование уровня активности пищеварительных ферментов осетровых видов рыб и их гибридов // Юг России. Экология, развитие. – 2010. – № 4. – С. 56–58.
11. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. – М.: Мир, 1982. – Т. 1–3.
12. Невалянный А. Н., Бедняков Д. А., Дзержинская И. С. Энзимология. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2005. – 102 с.
13. Глинский В. В., Ионин В. Г. Статистический анализ: Руководство по обучению. – М.: ИНФРА-М, Новосибирск: Сибирское соглашение, 2002. – 241 с.
14. Калоус В., Павличек З. Биофизическая химия. – М.: Мир, 1985. – 384 с.
15. Бедняков Д. А. Модификационное регулирование уровня активности некоторых пищеварительных ферментов у рыб: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Астрахань 2004. – 24 с.
16. Бедняков Д. А., Невалянная Л. А., Новинский В. Ю. Влияние ионов металлов на ферменты мембранного пищеварения белуги, стерляди и их гибридов – бестера и стербела // Вестн. Астрахан. гос. техн. ун-та. Сер.: Рыбное хозяйство. – 2011. – № 2. – С. 74–77.

Статья поступила в редакцию 26.07.2012

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Бедняков Дмитрий Андреевич – Астраханский государственный технический университет; канд. биол. наук, доцент; доцент кафедры «Социально-культурный сервис и туризм»; bednyakovd@rambler.ru.

Bednyakov Dmitriy Andreevich – Astrakhan State Technical University; Candidate of Biological Sciences, Assistant Professor; Assistant Professor of the Department "Social-Cultural Service and Tourism"; bednyakovd@rambler.ru.

Невалянный Александр Николаевич – Астраханский государственный технический университет; д-р биол. наук, профессор; профессор кафедры «Гидробиология и общая экология»; nevalenny@rambler.ru.

Nevalenny Alexander Nickolaevich – Astrakhan State Technical University; Doctor of Biological Sciences, Professor; Professor of the Department "Hydrobiology and General Ecology"; nevalenny@rambler.ru.

Коростелёв Сергей Георгиевич – Камчатский государственный технический университет; д-р биол. наук; профессор кафедры «Водные биоресурсы и аквакультура»; korostelevs@mail.ru.

Korostelev Sergey Georgievich – Kamchatskiy State Technical University; Doctor of Biological Sciences; Professor of the Department "Aquatic Bioresources and Aquaculture"; korostelevs@mail.ru.