

УДК 597-1.132:[504.054:546.815]
ББК 28.903

И. Л. Голованова, Г. А. Урванцева

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ СВИНЦА НА АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ У РЫБ-БЕНТОФАГОВ ИЗ УЧАСТКОВ РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА С РАЗНОЙ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКОЙ

I. L. Golovanova, G. A. Urvantseva

EFFECTS OF LEAD IONS ON THE ACTIVITY OF GLYCOSIDASE IN THE INTESTINE OF FISH BENTHOPHAGE FROM THE RYBINSK RESERVOIR AREAS WITH DIFFERENT ANTHROPOGENIC LOAD

Изучено *in vitro* влияние ионов свинца (Pb^{2+}) в концентрации 0,01–25 мг/л на активность гликозидаз (мальтаза, амилолитическая активность) в слизистой оболочке кишечника взрослых рыб-бентофагов (лещ *Abramis brama* (L.), масса 1200–1230 г и плотва *Rutilus rutilus* (L.), масса 300–320 г), обитающих в районах Рыбинского водохранилища с разной антропогенной нагрузкой. Амилолитическую активность определяли методом Нельсона, активность мальтазы – глюкозооксидазным методом. Ионы свинца Pb^{2+} вызывают разнонаправленные изменения активности гликозидаз, при этом ферменты леща более чувствительны к действию ионов свинца по сравнению с ферментами плотвы. Ферменты рыб, отловленных в более чистом Волжском плесе, наиболее чувствительны к негативному действию ионов свинца по сравнению с ферментами рыб из более загрязненного Шекснинского плеса.

Ключевые слова: рыбы, лещ, плотва, пищеварительные гликозидазы, амилолитическая активность, мальтаза, тяжелые металлы, свинец.

The effects of lead ions (Pb^{2+}) in concentrations 0,1–25 mg/l on the activity of glycosidase (maltase, amylolytic activity) in the intestinal mucosa of adult bream *Abramis brama* (L.), mass 1200–1230 g and roach *Rutilus rutilus* (L.), mass 300–320 g from the Rybinsk reservoir areas with different anthropogenic load have been studied *in vitro*. The amylolytic activity was determined by Nelson method and the maltase activity – by the glucose-oxidase method. The lead ions cause multi-directional changes of the digestive glycosidase activity. It is shown that the enzymes in bream are more sensitive to lead than in roach. Enzymes in fish from relatively pure Volga reach are more sensitive to the negative effect of lead ions than in fish from more polluted Sheksninskiy reach.

Key words: fish, bream, roach, digestive glycosidase, amylolytic activity, maltase, heavy metals, lead.

Введение

Свинец относится к группе тяжелых металлов, входящих в состав основных загрязнителей окружающей среды. Наряду с кадмием он не играет существенной роли в процессах жизнедеятельности, но обладает высокой токсичностью при относительно низких концентрациях. Поступая в организм с водой и пищей, он способен аккумулироваться в организме гидробионтов в концентрациях, превышающих его содержание в окружающей среде [1–3]. Для воды водоемов рыбохозяйственного назначения ПДК свинца составляет 6 мкг/л, однако в районах техногенного загрязнения его содержание в мышцах и печени пресноводных рыб достигает 2–15 мг/кг [1]. Высокие значения концентрации свинца отмечены в донных отложениях водоемов и в кормовых объектах рыб-бентофагов [1, 3]. Попадая в организм рыб, тяжелые металлы могут оказывать прямое и опосредованное влияние на активность ферментов пищеварительного тракта. Поскольку значительное количество тяжелых металлов накапливается в грунтах, бентосоядные рыбы являются наиболее удобным объектом для изучения действия тяжелых металлов на процессы пищеварения.

Цель исследований – изучить влияние ионов свинца *in vitro* на активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника рыб-бентофагов, обитающих в районах Рыбинского водохранилища с разной антропогенной нагрузкой.

Материалы и методы исследования

Объекты исследования – лещ *Abramis brama* (L.) и плотва *Rutilus rutilus* (L.) – массовые виды рыб Рыбинского водохранилища, имеющие большое промысловое значение. Рыбы отловлены

ставными сетями в марте – апреле 2011–2012 гг. на двух участках Рыбинского водохранилища (58°30' с. ш., 38°20' в. д.), отличающихся по степени антропогенной нагрузки: в Шекснинском плесе (ст. Любец), в который поступают бытовые и сточные воды г. Череповец, и в Волжском плесе (ст. Коприно), наиболее удаленном от локального источника загрязнения. После поимки рыб обездвигивали, кишечники извлекали и хранили при температуре –18 °С не более 1 месяца. Масса леща из Волжского плеса составляла 1200 ± 130 г, длина тела – $40,0 \pm 1,3$ см, из Шекснинского – 1230 ± 64 г и $41,6 \pm 0,6$ см соответственно. Масса плотвы из Волжского плеса составляла 302 ± 50 г, длина тела – $25,5 \pm 1,5$ см, из Шекснинского плеса – $317,6 \pm 150$ г и $25,6 \pm 3,5$ см.

Активность гликозидаз (мальтаза и амилолитическая активность) определяли в гомогенатах слизистой оболочки медиального отдела кишечника. Амилолитическую активность, отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал (α -амилаза КФ 3.2.1.1, глюкоамилаза КФ 3.2.1.3 и мальтаза КФ 3.2.1.20) оценивали по приросту гексоз модифицированным методом Нельсона [4]. Активность мальтазы определяли глюкозооксидазным методом с помощью набора для клинической биохимии «Фотоглюкоза» (ООО «Импакт», Россия). Инкубацию гомогенатов и субстратов проводили при температуре 20 °С и pH 7,4 в течение 20–60 мин. При оценке влияния ионов свинца гомогенаты предварительно инкубировали в присутствии азотнокислой соли свинца $Pb(NO_3)_2$ в течение 1 часа. Значения концентрации ионов Pb^{2+} , рассчитанные по общему содержанию металла в соли, составляли 0 (контроль); 0,01; 0,1; 1; 5; 10 и 25 мг/л. Выбор диапазона концентраций обусловлен значениями ПДК этих металлов и их содержанием в тканях рыб и их кормовых объектов [1–3]. Ферментативную активность выражали в микромолях продуктов реакции, образующихся за 1 минуту инкубации ферментативно-активного препарата и субстрата в расчете на 1 г влажной массы ткани, мкмоль/(г · мин). Результаты представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm m$). Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного анализа (ANOVA, LSD-тест) при $p = 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Уровень амилолитической активности в кишечнике леща и плотвы из Шекснинского плеса на 15–30 % ниже, чем у рыб из более чистого Волжского плеса (табл.). В то же время активность мальтазы у рыб из разных плесов не различалась. Ионы свинца достоверно изменяют активность исследованных гликозидаз во всех вариантах опыта ($p < 0,013$), исключая активность мальтазы в кишечнике плотвы Шекснинского плеса ($p = 0,2110$). С увеличением концентрации ионов свинца амилолитическая активность у леща из обоих плесов достоверно снижается. У рыб из Волжского плеса снижение ферментативной активности на 10–27 % отмечено при концентрации 0,01–25 мг/л, из Шекснинского – на 10–22 % лишь при концентрации 5–25 мг/л. При этом прямой зависимости тормозящего эффекта от концентрации металла не выявлено. У плотвы из более чистого плеса амилолитическая активность снижается на 11–12 % лишь при концентрации ионов свинца 5 и 10 мг/л, из более загрязненного Шекснинского плеса повышается на 11–22 % практически во всем диапазоне концентраций. Активность мальтазы у леща из Волжского плеса снижается на 16–30 % при концентрации ионов металла 1–25 мг/л, из Шекснинском плеса, напротив, возрастает на 9–16 % в диапазоне концентраций ионов свинца 0,01–10 мг/л. Однако четкого концентрационно-зависимого эффекта не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии прямого действия металла на молекулу фермента. Активность мальтазы в кишечнике плотвы из Волжского плеса достоверно повышалась на 16 % лишь при концентрации ионов свинца 10 мг/л, у леща Шекснинского плеса достоверных эффектов не обнаружено.

В целом свинец оказывает больший тормозящий эффект на амилолитическую активность, что, по всей вероятности, связано с большей чувствительностью панкреатической α -амилазы, входящей в состав ферментов, гидролизующих крахмал, по сравнению с мембранным ферментом мальтазой. Сопоставление активности одноименных ферментов у рыб, выловленных в Волжском и Шекснинском плесах, выявило существенные различия. Так, у леща из более чистого плеса тормозящий эффект выявлен в более широком диапазоне концентраций ионов свинца по сравнению с загрязненным плесом. У плотвы ингибирующий эффект свинца на амилолитическую активность отмечен лишь у рыб Волжского плеса. Активность мальтазы у леща из Волжского плеса с ростом концентрации металла снижается, в то время как у леща из Шекснинского плеса повышается. Различия в динамике активности ферментов в присутствии свинца у рыб из двух плесов могут быть связаны с разной антропогенной нагрузкой. Действительно, во всех компонентах экосистемы Шекснинского плеса на протяжении нескольких десятков лет со-

держится значительное количество тяжелых металлов и органических загрязнителей [1, 5]. Вполне вероятно, что в условиях хронического загрязнения у рыб лучше развиты системы детоксикации и выведения из организма тяжелых металлов. У рыб из более чистого Волжского плеса в присутствии свинца в большинстве случаев происходит торможение активности гликозидаз, не приспособленных к повышенному содержанию металла в среде. Эти результаты хорошо согласуются с данными по активности ферментов антиоксидантной системы печени и показателей перекисного окисления липидов, которые свидетельствуют о неблагоприятном состоянии леща Шекснинского плеса Рыбинского водохранилища [6].

**Активность гликозидаз в слизистой оболочке кишечника леща и плотвы
из относительно чистого (Волжский плес) и загрязненного (Шекснинский плес) участков
Рыбинского водохранилища, мкмоль/(г · мин) ***

Концентрация ионов Pb, мг/л	Лещ		Плотва	
	Волжский плес	Шекснинский плес	Волжский плес	Шекснинский плес
	Амилолитическая активность			
Контроль (0)	1,55 ± 0,01 ^a	1,32 ± 0,01 ^a	2,75 ± 0,12 ^a	1,92 ± 0,05 ^a
0,01	1,40 ± 0,02 ^{a,b}	1,23 ± 0,03 ^{a,b}	3,47 ± 0,06 ^b	2,13 ± 0,06 ^b
0,1	1,40 ± 0,02 ^{a,b}	1,39 ± 0,04 ^a	2,48 ± 0,03 ^{a,b}	2,16 ± 0,05 ^b
1	1,35 ± 0,02 ^b	1,37 ± 0,02 ^{a,b}	2,80 ± 0,04 ^a	2,35 ± 0,03 ^b
5	1,44 ± 0,02 ^b	1,03 ± 0,01 ^b	2,43 ± 0,05 ^b	2,32 ± 0,05 ^b
10	1,27 ± 0,01 ^г	1,07 ± 0,02 ^b	2,45 ± 0,03 ^b	1,95 ± 0,03 ^a
25	1,13 ± 0,02 ^г	1,19 ± 0,01 ^b	2,72 ± 0,07 ^a	2,24 ± 0,05 ^{b,b}
	Активность мальтазы			
Контроль (0)	3,26 ± 0,09 ^a	3,16 ± 0,04 ^a	6,11 ± 0,20 ^a	6,22 ± 0,08 ^a
0,01	3,22 ± 0,13 ^a	3,67 ± 0,12 ^b	6,13 ± 0,22 ^a	6,02 ± 0,28 ^a
0,1	3,23 ± 0,07 ^a	3,50 ± 0,05 ^b	6,74 ± 0,12 ^{a,b}	6,80 ± 0,37 ^a
1	2,75 ± 0,10 ^b	3,62 ± 0,14 ^b	5,95 ± 0,24 ^a	6,51 ± 0,26 ^a
5	2,29 ± 0,03 ^b	3,58 ± 0,09 ^b	6,31 ± 0,26 ^{a,b}	6,72 ± 0,28 ^a
10	2,28 ± 0,02 ^b	3,45 ± 0,07 ^b	7,08 ± 0,15 ^b	6,95 ± 0,24 ^a
25	2,31 ± 0,03 ^b	3,41 ± 0,10 ^{a,b}	6,37 ± 0,13 ^{a,b}	6,43 ± 0,19 ^a

* Разные надстрочные индексы указывают на статистически достоверные различия между показателями в каждом столбце (ANOVA, LSD-тест), $p < 0,05$.

Гликозидазы плотвы более устойчивы к действию свинца по сравнению с гликозидазами леща, что может быть связано с большим количеством тяжелых металлов в ее естественной пище. Действительно, в питании пойменно-придонной экологической формы плотвы преобладает дрейссена, в тканях которой зарегистрирован высокий уровень содержания тяжелых металлов, в том числе и свинца [3]. Механизм токсического действия свинца на пищеварительные ферменты рыб до сих пор не изучен и, по всей вероятности, неспецифичен. Поскольку существует несколько изоформ α-амилазы, глюкоамилазы и мальтазы, нельзя исключить молекулярную разнокачественность ферментов, функционирующих в кишечнике рыб из относительно чистого и загрязненного районов. Кроме того, выявленные различия могут быть обусловлены изменением состава кормовой базы, спектра питания и биохимического состава пищи у рыб, обитающих в загрязненном районе, а также разным влиянием токсических веществ на чувствительность панкреатических и собственно кишечных гликозидаз к действию ионов свинца.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о более низком уровне амилолитической активности и активности мальтазы в слизистой оболочке кишечника леща и плотвы, выловленных в загрязненном Шекснинском плесе Рыбинского водохранилища, по сравнению с рыбами, выловленными в относительно чистом Волжском плесе. В присутствии ионов свинца в концентрации 0,01–25 мг/л у исследованных видов рыб выявлены разнонаправленные изменения активности гликозидаз, при этом ферменты леща более чувствительны к действию ионов свинца по сравнению с ферментами плотвы. Гликозидазы рыб, отловленных в более чистом плесе, наиболее чувствительны к негативному действию ионов свинца по сравнению с гликозидазами рыб более загрязненного плеса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Перевозников М. А.* Тяжелые металлы в пресноводных экосистемах / М. А. Перевозников, Е. А. Богданова. СПб.: Гос. науч.-исслед. ин-т озер. и реч. хоз-ва, 1999. 228 с.
2. *Askary Sary A.* Lead bioaccumulation and toxicity in tissue of economically fish species from river and marine water / A. Askary Sary, M. Mohammadi // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2012. Vol. 89, N 1. P. 82–85.
3. *Светашова Е. С.* К вопросу накопления тяжелых металлов в водных экосистемах / Е. С. Светашова // *Экологические проблемы пресноводных рыбохозяйственных водоемов России: Всерос. науч. конф. с междунар. участием.* Казань, 2011. С. 371–375.
4. *Уголев А. М.* Определение активности инвертазы и других дисахаридаз / А. М. Уголев, Н. Н. Иезуитова // *Исследование пищеварительного аппарата у человека.* Л.: Наука, 1969. С. 192–196.
5. *Флеров Б. А.* Комплексная оценка состояния донных отложений Рыбинского водохранилища / Б. А. Флеров, И. И. Томилина, Л. Кливленд, А. И. Баканов, М. В. Гапеева. // *Биология внутр. вод.* 2000. № 2. С. 148–155.
6. *Morozov A. A.* Functional State of the Liver Antioxidant System of the Bream *Abramis brama* (L.) from Rybinsk Reservoir Regions with Different Anthropogenic Loads / A. A. Morozov, G. M. Chuiko, E. S. Brodskii // *Inland Water Biology.* 2012. Vol. 5, N 1. P. 147–152.

REFERENCES

1. *Perevoznikov M. A., Bogdanova E. A.* *Tiazhelye metally v presnovodnykh ekosistemakh* [Heavy metals in freshwater ecosystems]. Saint Petersburg, Gosudarstvennyi nauchno-issledovatel'skii institut ozernogo i rechnogo khoziaistva, 1999. 228 p.
2. *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, no. 1, pp. 82–85.
3. *Svetashova E. S.* K voprosu nakopleniia tiazhelykh metallov v vodnykh ekosistemakh [To the problem of accumulation of heavy metals in water ecosystems]. *Ekologicheskie problemy presnovodnykh rybokhoziaistvennykh vodoemov Rossii. Vserossiiskaia nauchnaia konferentsiia s mezhdunarodnym uchastiem.* Kazan, 2011, pp. 371–375.
4. *Ugolev A. M., Iezuitova N. N.* Opredelenie aktivnosti invertazy i drugikh disakharidaz [Determination of activity of invertase and other disaccharidase]. *Issledovanie pishchevaritel'nogo apparata u cheloveka.* Leningrad, Nauka, 1969, pp. 192–196.
5. *Flerov B. A., Tomilina I. I., Klivlend L., Bakanov A. I., Gapeeva M. V.* Kompleksnaia otsenka sostoianii donnykh otlozhenii Rybinskogo vodokhranilishcha [Complex evaluation of the state of bottom sediments of Rybinsk water reservoir]. *Biologiya vnutrennikh vod*, 2000, no. 2, pp. 148–155.
6. *Morozov A. A., Chuiko G. M., Brodskii E. S.* Functional State of the Liver Antioxidant System of the Bream *Abramis brama* (L.) from Rybinsk Reservoir Regions with Different Anthropogenic Loads. *Inland Water Biology*, 2012, vol. 5, no. 1, pp. 147–152.

Статья поступила в редакцию 30.08.2013

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Голованова Ирина Леонидовна – Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина Российской академии наук, пос. Борок, Ярославская обл.; г-р биол. наук, старший научный сотрудник; главный научный сотрудник лаборатории экологии рыб; golovanova5353@mail.ru.

Golovanova Irina Leonidovna – I. D. Papanin Institute of Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Yaroslavl region; Doctor of Biology, Senior Research Worker; Major Research Scientist of the Laboratory of Fish Ecology; golovanova5353@mail.ru.

Урванцева Галина Александровна – Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова; канд. хим. наук, доцент; доцент кафедры «Органическая и биологическая химия»; urvga@mail.ru.

Urvantseva Galina Aleksandrovna – Demidov's Yaroslavl State University; Candidate of Chemistry, Assistant Professor; Assistant Professor of the Department "Organic and Biology Chemistry"; urvga@mail.ru.