

*На правах рукописи*

УШАКОВА (КОРЮКАЕВА)  
Наталья Владимировна

**Влияние тяжелых металлов  
(цинк, медь), температуры и рН на активность  
протеиназ рыб и их потенциальных объектов  
питания**

Специальность 03.00.16 – экология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Борок - 2009

Работа выполнена в Институте биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Кузьмина Виктория Вадимовна**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Микряков Вениамин Романович**

доктор биологических наук  
**Груздков Андрей Андреевич**

**Ведущая организация:** Институт биологии Карельского научного центра РАН.

Защита диссертации состоится «14» апреля 2009 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета ДМ 002.036.01 при Институте биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН по адресу: 152742, п.Борок Некоузского р-на Ярославской обл.

Тел./факс: (48547) 24042

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2009г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук



Л.Г. Корнева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Одна из острейших проблем современности – глобальное, прогрессирующее антропогенное загрязнение гидросферы. Одними из приоритетных химических загрязнителей являются тяжелые металлы, многие из которых обладают высокой биологической активностью и способны аккумулироваться в различных тканях гидробионтов, не подвергаясь биодеградации (Строганов, 1968; Лукьяненко, 1983; Линник, Набиванец, 1986; Алабастер, Ллойд, 1984; Мур, Рамамурти, 1987; Решетников, Шатуновский, 1997; Моисеенко, 1999; Кашулин, Терентьев, 2004; Немова, Высоцкая, 2004; Комов и др., 2004; Немова, 2005). Под их влиянием изменяется поведение, а также структурно-функциональные характеристики различных органов и тканей рыб (Алабастер, Ллойд, 1984; Флеров, 1989; Матей, 1996; Микряков и др., 2001; Моисеенко и др., 2006). Известно, что тяжелые металлы снижают активность протеиназ пищеварительного тракта рыб (Sastri, Gupta, 1979; Gupta, Sastri, 1981; Golovanova et al., 1999; Kuz'mina et al., 1999; Туктаров, 2002; Кузьмина и др., 2003; Неваленый и др., 2003). Однако имеющиеся сведения отрывочны. Поскольку в последние годы доказана важная роль в процессах пищеварения рыб ферментов объектов питания (Кузьмина, 2000; Скворцова, 2002; Kuz'mina, Golovanova, 2004; Кузьмина и др., 2004а,б), представляется целесообразным исследовать действие тяжелых металлов не только на гидролазы консумента, но и на ферменты, особенно протеиназы, их жертв. Влияние металлов, относящихся к биогенным элементам, таких как цинк и медь, на протеиназы, участвующие в деградации белковых компонентов пищи рыб, исследовано слабо, на ферменты потенциальных жертв ранее не анализировалось. Вместе с тем изучение влияния ионов цинка и меди на активность протеиназ пищеварительного тракта рыб и их потенциальных объектов питания исключительно важно, поскольку эти металлы, будучи жизненно необходимыми (Алабастер, Ллойд, 1984; Watanabe et al., 1997; Остроумова, 2001), при повышении концентрации становятся токсичными (Алабастер, Ллойд, 1984; Мур, Рамамурти, 1987).

Следует отметить, что влияние тяжелых металлов на активность протеиназ ранее, как правило, исследовали без учета вариабельности значений таких важных параметров среды, как температура и рН. Однако в последние годы помимо естественных флуктуаций температуры наблюдается тепловое загрязнение водоемов, а также их закисление, приводящие к изменению температуры и рН энтеральной среды у гидробионтов и провоцирующие хронический стресс. Сведения о совместном действии температуры, рН и биогенных металлов на активность протеиназ пищеварительного тракта рыб, а также целого организма их потенциальных объектов питания до начала нашей работы отсутствовали.

**Цель работы:** изучение раздельного и комплексного влияния ионов тяжелых металлов (цинк, медь), температуры и рН на активность протеиназ,

функционирующих в слизистой оболочке пищеварительного тракта рыб разных экологических групп и в целом организме их потенциальных объектов питания, а также влияния этих металлов на температурные характеристики протеолитических ферментов консументов и жертв.

#### **Задачи исследования:**

1. Сравнить активность протеиназ слизистой оболочки пищеварительного тракта рыб, значительно различающихся по характеру питания (ихтиофаги, планктофаги и бентофаги), и целого организма их потенциальных объектов питания (рыбы младших возрастных групп и представители типов Mollusca, Annelida и Arthropoda).
2. Исследовать раздельное и комплексное влияние ионов тяжелых металлов (цинк или медь), температуры и pH на активность протеиназ слизистой оболочки пищеварительного тракта рыб и целого организма их потенциальных объектов питания рыб.
3. Изучить влияние ионов цинка и меди на температурные характеристики протеолитических ферментов пищеварительного тракта консумента и целого организма жертвы (на примере тюльки).

#### **Защищаемые положения:**

1. Цинк и медь в концентрациях, встречающихся в естественной пище и не превышающих ДОК, значительно снижают активность протеиназ пищеварительного тракта консументов и целого организма их потенциальных жертв.
2. Эффекты цинка и меди на активность протеиназ в значительной мере зависят от температуры и pH.
3. Активность протеиназ слизистой оболочки желудка в меньшей степени подвержена влиянию ионов цинка и меди, а также температуры и pH, чем активность протеиназ, функционирующих в кишечнике.
4. Цинк и медь значительно влияют на температурные характеристики протеиназ пищеварительного тракта консументов, а также целого организма их жертв.

**Научная новизна.** Впервые в единых методических условиях получены и сопоставлены данные по активности протеиназ пищеварительного тракта рыб и в целом организме их потенциальных объектов питания в широком диапазоне значений температуры и pH, а также в присутствии ионов цинка и меди в концентрациях, встречающихся в естественной пище рыб и не превышающих допустимые остаточные концентрации. Показано, что токсическое действие ионов цинка и меди зависит как от температуры, так и от pH среды. При этом взаимодействие температуры, pH и тяжелых металлов (цинк, медь) видоизменяет их раздельные эффекты на активность протеиназ, функционирующих в слизистой оболочке пищеварительного тракта рыб, а также в целом организме их объектов питания. Установлено, что раздельные и комплексные эффекты исследованных факторов у представителей разных таксонов животных различны. Впервые изучены температурные

характеристики протеолитических ферментов пищеварительного тракта и целого организма рыб на примере массового вида-вселенца водоемов Верхней Волги – тюльки. Исследовано влияние на эти ферменты ионов тяжелых металлов. Показано, что протеиназы пищеварительного тракта тюльки адаптированы к функционированию в широком диапазоне температур, что позволяет рыбам активно питаться при низкой температуре. Выявлено значительное изменение температурных характеристик протеиназ пищеварительного тракта и целого организма рыб в присутствии ионов цинка и меди.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Выявленные закономерности позволяют оценить неизвестные ранее аспекты молекулярных основ трофических взаимоотношений рыб и их потенциальных объектов питания при меняющихся условиях окружающей среды. Данные, свидетельствующие о том, что взаимодействие природных и антропогенных факторов существенно отличается от их отдельных эффектов, могут быть использованы при разработке новых подходов к определению нагрузок на водные экосистемы. Результаты, касающиеся негативного влияния тяжелых металлов на активность протеиназ консументов и их потенциальных жертв, важны для оптимизации состава кормов и параметров среды при выращивании рыб в условиях аквакультуры. Полученные данные могут быть использованы в лекционных курсах и практикумах по экологии, а также экологической, сравнительной и эволюционной физиологии.

**Апробация работы.** Материалы были представлены и доложены на Международной конференции «Современные проблемы водной токсикологии» (Борок, 2005); XIII Международном совещании по эволюционной физиологии памяти Л.А.Орбели. (Санкт-Петербург, 2006); Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные проблемы физиологии пищеварения и питания» (Санкт-Петербург, 2006); IV-VI Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2005, 2007, 2008); Международной конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов – 2» (Борок, 2007); Международной конференции «Естественные и инвазионные процессы формирования разнообразия водных и наземных экосистем» (Ростов-на-Дону, 2007); II научной конференции с участием стран СНГ «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск, 2007); Всероссийской конференции с международным участием «Водные и наземные экосистемы: проблемы и перспективы исследований» (Вологда, 2008).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 13 статей, в том числе 6 в журналах входящих в перечень ВАК РФ, и 6 тезисов.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста, состоит из введения, пяти глав, выводов, списка литературы, включающего 366 наименований, в том числе 217 на иностранном языке, и содержит 19 рисунков и 15 таблиц, 5 из которых – в приложении.

**Благодарность.** Выражаю глубокую благодарность: д.б.н. В.В. Кузьминой за предоставленную тему диссертации, руководство на всех этапах ее выполнения и доброжелательную поддержку, д.б.н. Г.М. Чуйко, д.б.н. И.Л. Головановой, д.б.н. Г.И. Извековой, к.б.н. Ю.В. Герасимову, к.б.н. Е.И. Извекову, к.б.н. В.А. Непомнящему и к.б.н. Б.А. Лёвину за ценные советы и замечания при обсуждении результатов работы, С.М. Ждановой и Н.Н. Жгаревой за помощь в сборе и определении видового состава зоопланктона и зообентоса, а также М.А. Наумовой за техническую помощь при выполнении некоторых этапов работы.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Обзор литературы

В главе представлены сведения о ферментных системах, обеспечивающих переваривание белковых компонентов пищи у рыб, различающихся по характеру питания, а также аутолитическую деградацию белка в тканях их потенциальных объектов питания – рыб и беспозвоночных. Рассмотрено влияние типа питания и биохимического состава пищи на активность протеиназ пищеварительного тракта рыб. Подробно разобрано влияние температуры и pH на активность протеолитических ферментов пищеварительного тракта и различных тканей рыб и беспозвоночных. Проанализировано действие ионов цинка и меди на организм рыб и отдельные звенья процесса экзотрофии.

### Глава 2. Материал и методы исследования

Работа проведена в 2003-2008 гг. в лаборатории экологии рыб Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН.

**Объекты исследования.** Консументы: 9 видов пресноводных костистых рыб (тип Vertebrata, кл. Osteichthyes), относящиеся к 5 отрядам и 5 семействам: отр. Clupeiformes – Сельдеобразные, сем. Clupeidae – Сельдевые, *Clupeonella cultriventris* (Nordmann) – черноморско-каспийская тюлька; отр. Salmoniformes – Лососеобразные, п/отр. Esocidae – Щуковидные, сем. Esocidae – Щуковые, *Esox lucius* L. – обыкновенная щука; отр. Cypriniformes – Карпообразные, сем. Cyprinidae – Карповые, *Abramis brama* (L.) – лещ, *Abramis ballerus* (L.) – синец, *Alburnus alburnus* (L.) – уклейка, *Rutilus rutilus* (L.) – плотва; отр. Gadiformes – Трескообразные, сем. Lotidae – Налимовые, *Lota lota* (L.) – налим; отр. Perciformes – Окунеобразные, сем. Percidae – Окуневые, *Perca fluviatilis* L. – речной окунь, *Zander lucioperca* (L.) – обыкновенный судак, обитающие в Рыбинском водохранилище.

Потенциальные объекты питания рыб-ихтиофагов: неполовозрелые особи 5 видов рыб: окунь, ерш обыкновенный *Gymnocephalus cernua* (L.) (отр. Perciformes, сем. Percidae), плотва, тюлька и карп *Cyprinus carpio* L. (отр. Cypriniformes, сем. Cyprinidae), а также сеголетки рыб сем. карповых Cyprinidae (преимущественно плотва, синец, густера *Blicca bjoerkna*, лещ – суммарно). Потенциальные объекты питания рыб бенто- и планктофагов: прудовик *Limnaea stagnalis*, катушка *Planorbarius purpura* (кл. Gastropoda, тип Mollusca), дрейссена *Dreissena polymorpha* (кл. Bivalvia, тип Mollusca), олигохеты *Tubifex sp.* и *Lumbriculus sp.*, суммарно (кл. Oligochaeta, тип Annelida), личинки хирономид *Chironomus sp.* и *Ch. riparius* (кл. Insecta, тип Arthropoda), а также представители зоопланктона – суммарная проба, включающая *Daphnia galeata*, *D. longispina*, *Chydorus sphaericus*, Nauplii, Copepodit, *Mesocyclops leuckarti*, *Cyclops vicinus*, *Eudiaptomus gracilis*, *Chaoborus sp.*, и суммарная проба, в которой доминировали дафнии *Daphnia longispina* (кл. Crustacea, тип Arthropoda). Все виды животных пойманы в Рыбинском водохранилище или прибрежных прудах.

Опыты проведены в условиях *in vitro*. Для определения активности протеиназ слизистой оболочки желудка и кишечника рыб использовали метод Ансона (Anson, 1938) в некоторой модификации (Кузьмина, Егорова, 1988). В качестве источников металлов использовали сульфаты цинка ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) и меди ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) в концентрации 10 мг/л в расчете на содержание ионов металла. Определения проводили в широком диапазоне значений температуры (0, 10, 20 и 37°C) и pH (3.0, 4.0 и 5.0 – для протеиназ слизистой оболочки желудка; 5.0, 7.4 и 8.5 – для протеиназ слизистой оболочки кишечника, а также 3.0, 5.0, 7.4 и 8.5 – для протеиназ целого организма жертв по гемоглобину и 5.0, 7.4 и 8.5 – для протеиназ целого организма жертв по казеину). Влияние ионов тяжелых металлов на температурные характеристики протеиназ тюльки исследовали в диапазоне температур от 0 до 70°C с интервалом 10°C. Энергию активации рассчитывали при помощи графического метода Аррениуса, коэффициенты  $Q_{10}$  – общепринятым способом.

Данные обработаны статистически с использованием приложения Excel программы MS'Office XP и Statgraph 6.0. При парном и множественном сравнении результатов проводили дисперсионный анализ (ANOVA) с последующей оценкой различий с использованием LSD теста,  $p \leq 0.05$  (Sokal, Rohlf, 1995).

### **Глава 3. Раздельное и комплексное влияние ионов тяжелых металлов (цинк, медь), температуры и pH на активность протеиназ пищеварительного тракта рыб**

Активность протеиназ пищеварительного тракта рыб при стандартных условиях. Сравнительный анализ активности протеиназ пищеварительного тракта у ряда видов рыб, различающихся по типу питания (ихтио-, планкто- и

Таблица 1. Уровень активности протеиназ пищеварительного тракта пресноводных видов костистых рыб при стандартных условиях (температура 20°C, pH для пепсиноподобных протеиназ 3.0, для трипсино- и химотрипсиноподобных протеиназ 7.4).

Тип питания	Вид рыб	Активность пепсиноподобных протеиназ, мкмоль/(г·мин)	Активность трипсиноподобных протеиназ, мкмоль/(г·мин)	Активность химотрипсиноподобных протеиназ, мкмоль/(г·мин)
Планктофаги	Тюлька (30)	7.66 ± 0.14	3.05 ± 0.09	3.83 ± 0.07
	Уклейка (15)	—	8.83 ± 0.07	1.88 ± 0.07
	Синец (6)	—	4.09 ± 0.05	1.83 ± 0.03
Бентофаги	Лещ (5)	—	3.82 ± 0.13	1.88 ± 0.13
	Плотва (8)	—	13.62 ± 0.16	3.55 ± 0.13
Факультативные ихтиофаги	Налим (5)	7.31 ± 0.12	5.77 ± 0.11	3.84 ± 0.06
	Окунь(7)	8.50 ± 0.14	6.19 ± 0.13	1.43 ± 0.03
Типичные ихтиофаги	Щука (3)	14.68 ± 0.17	11.12 ± 0.23	4.45 ± 0.03
	Судак (4)*	7.65 ± 0.08	2.75 ± 0.08	1.73 ± 0.03

Примечание. Представлены средние и ошибки средних ( $M \pm m$ ). В скобках указано количество исследованных особей каждого вида. \* – голодные рыбы.

бентофаги), подтвердил представления о том, что протеолитическая активность летом в период интенсивного питания (у налима – зимой) выше у видов, в пище которых преобладают белковые компоненты (Капоог et al., 1975; Hofer, Shieme, 1981; Уголев, Кузьмина, 1993; Hidalgo et al., 1999; Кузьмина, 2005). Межвидовые различия уровня активности трипсиноподобных протеиназ выражены значительно, чем таковые пепсино- и химотрипсиноподобных протеиназ. При этом активность казеинлитических протеиназ обычно выше таковой гемоглобинлитических (табл. 1). Полученные данные хорошо согласуются со сведениями о том, что у малазийского склеропагеса *Scleropages formosus* активность трипсина в поджелудочной железе и кишечнике значительно превышает активность химотрипсина (Natalia et al., 2004).

Раздельное и комплексное влияние температуры, pH и тяжелых металлов на активность пепсиноподобных протеиназ слизистой оболочки желудка типичных и факультативных ихтиофагов. Исследование влияния температуры на активность пепсиноподобных протеиназ показало, что при стандартных значениях pH (3.0) при снижении температуры от 20 до 0°C уровень активности у всех исследованных видов уменьшается в пределах 30%. При повышении значений pH от 3.0 до 5.0 степень снижения активности протеиназ значительно варьирует у рыб разных видов: у щуки активность практически не изменяется, у окуня снижается на 70%. Металлы менее существенно влияют на ферментативную активность, которая снижается не более чем на 15%. Эффекты во всех случаях достоверны

( $p \leq 0.001$ ). При комплексном действии исследуемых факторов ингибиторные эффекты усиливаются. Наиболее устойчивыми оказались протеиназы желудка щуки: при температуре  $0^\circ\text{C}$ , pH 5.0 в присутствии ионов металлов активность снижается в пределах 40% (рис. 1а). Наименее устойчивы ферменты желудка окуня: в тех же условиях активность снижается на 95% (рис. 1б). При этом достоверность полифакторных эффектов значительно ниже монофакторных эффектов.

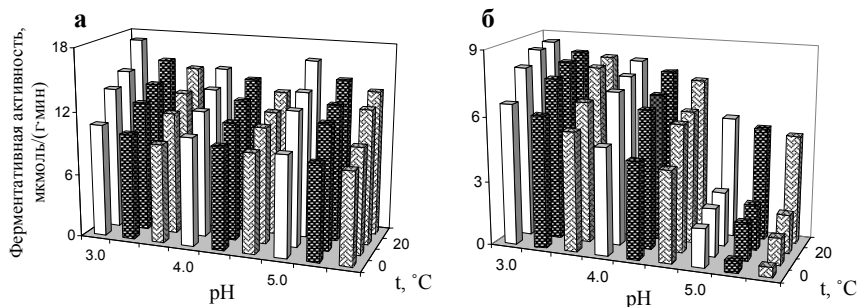


Рис.1. Влияние температуры, pH, ионов меди и цинка на активность пепсиноподобных протеиназ слизистой оболочки желудка щуки (а) и окуня (б). Обозначения. Здесь и на рис. 2 и 3. □ – контроль, ■ – активность в присутствии ионов цинка, ▨ – активность в присутствии ионов меди.

Раздельное и комплексное влияние температуры, pH и тяжелых металлов на активность трипсино- и химотрипсиноподобных протеиназ слизистой оболочки кишечника типичных и факультативных икhtiофагов. Трипсино- и химотрипсиноподобные протеиназы слизистой оболочки кишечника рыб в большей степени подвержены влиянию исследованных факторов, чем ферменты желудка (рис. 2). При уменьшении температуры от  $20^\circ\text{C}$  до  $0^\circ\text{C}$

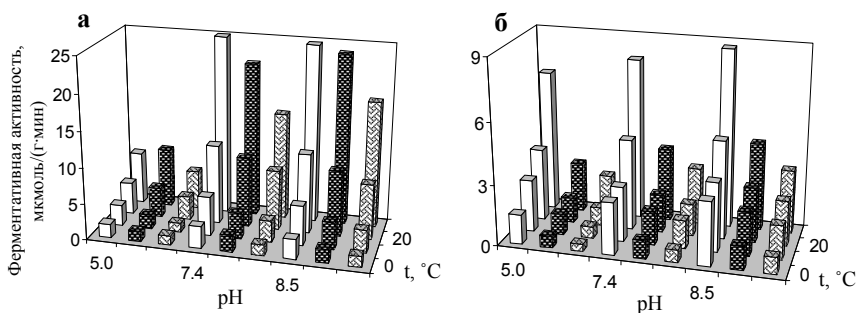


Рис.2. Влияние температуры, pH, меди и цинка на активность трипсино- (а) и химотрипсиноподобных протеиназ (б) слизистой оболочки кишечника щуки.

уровень активности трипсиноподобных протеиназ у рыб разных видов снижается в диапазоне 70-90%, химотрипсиноподобных – в диапазоне 30-75%. В меньшей степени на активность протеиназ влияет рН среды. Токсический эффект меди на активность ферментов, выше, чем у цинка. Активность трипсиноподобных протеиназ в присутствии цинка снижается на 5-20%, в присутствии меди – на 15-40%. Химотрипсиноподобные протеиназы менее устойчивы к негативному действию ионов тяжелых металлов: активность уменьшается на 15-65%. Снижение активности ферментов под действием ионов металлов при 0°C в большинстве случаев несколько выше по сравнению с таковым при 20°C. Активность протеиназ существенно снижается при комплексном действии температуры 0°C и рН 5.0. При совместном действии температуры и металлов максимальный эффект также отмечается при температуре 0°C. Активность в обоих случаях уменьшается на 65-95%. При комплексном действии всех исследованных факторов ингибиторные эффекты несколько усиливаются: активность обеих протеиназ снижается на 85-98%. При этом величина эффекта не зависит от характерного для вида уровня активности ферментов. Раздельные и комплексные эффекты исследованных факторов, как правило, достоверны (преимущественно  $p \leq 0.01$ ).

Раздельное и комплексное влияние температуры, рН и тяжелых металлов на активность протеиназ слизистой оболочки кишечника бентофагов. Химотрипсиноподобные протеиназы леща и плотвы более устойчивы к действию низких температур по сравнению с трипсиноподобными протеиназами: при 0°C активность первых снижается на 45 и 65% соответственно, вторых у обоих видов – на 80%. При уменьшении рН от 7.4 до 5.0, а также при увеличении до 8.5 изменения активность протеиназ не превышают 35%. В присутствии меди активность во всех случаях снижается значительно (30-70%), чем в присутствии цинка (5-45%). При повышении рН до 8.5 степень снижения активности ферментов под действием металлов у обоих видов несколько уменьшается. При понижении температуры до 0°C эффекты металлов, как правило, усиливаются. Химотрипсиноподобные протеиназы также более устойчивы к совместному действию исследованных факторов, чем трипсиноподобные протеиназы. При комплексном действии температуры 0°C и ионов металлов активность первых снижается на 50-85%, вторых – на 80-95%. При комплексном действии всех исследованных факторов эффекты в большинстве случаев незначительно усиливаются. Максимальное снижение активности при температуре 0°C, рН 5.0 и в присутствии меди достигает 95%. В абсолютном большинстве случаев исследованные факторы и их сочетание достоверно изменяют уровень активности протеиназ (обычно  $p \leq 0.001$ ).

Раздельное и комплексное влияние температуры, pH и тяжелых металлов на активность протеиназ слизистой оболочки кишечника типичных планктофагов. Как и в случае ихтио- и бентофагов, на активность протеиназ слизистой оболочки кишечника планктофагов наиболее сильно влияет температура. Так, уменьшение температуры от 20°C до 0°C (pH 7.4) приводит к снижению активности трипсиноподобных протеиназ у уклейки и синца на 75%, повышение температуры до 37°C, напротив, к увеличению на 45 и 150% соответственно. Активность химоотрипсиноподобных протеиназ у тех же видов при 0°C снижается лишь на 40 и 50%, при температуре 37°C активность значительно увеличивается – на 180 и 270%. Химоотрипсиноподобные протеиназы обоих видов более устойчивы и к действию кислых значений pH, но в большей мере подвержены влиянию ионов тяжелых металлов. Негативный эффект металлов на активность трипсиноподобных протеиназ усиливается при смещении pH в сторону кислых значений. При снижении температуры степень уменьшения активности в присутствии металлов также увеличивается. При комплексном действии факторов уровень активности обеих протеиназ наиболее значительно снижается при действии температуры 0°C, pH 5.0 и в присутствии ионов меди (на 85-95%). Во всех случаях температура, pH, тяжелые металлы и их сочетание достоверно изменяют уровень ферментативной активности (как правило,  $p \leq 0.001$ ).

Раздельное и комплексное влияние температуры, pH и тяжелых металлов на активность протеиназ слизистой оболочки пищеварительного тракта факультативного планктофага тюльки. Снижение температуры до 0°C при pH 3.0 вызывает двукратное уменьшение активности пепсиноподобных протеиназ. В присутствии цинка и меди при температуре 20°C ферментативная активность снижается на 7 и 18% соответственно. При комплексном воздействии температуры 0°C и pH 5.0 уровень активности протеиназ желудка снижается на 70%, в присутствии ионов металлов при температуре 0°C – в пределах 60%. При температуре 0°C, pH 5.0 и в присутствии металлов ферментативная активность уменьшается на 75%. Снижение температуры до 0°C приводит к достоверному торможению трипсиноподобных протеиназ кишечника на 80, химоотрипсиноподобных – на 70%, повышение температуры до 37°C, напротив – к увеличению на 200 и 45% соответственно. В присутствии тяжелых металлов активность ферментов снижается на 20-25%. Максимальные эффекты при совместном действии двух факторов отмечены при температуре 0°C и в присутствии меди (активность снижается до 90%). При комплексном действии ионов металлов, кислых значений pH (5.0) и температуры 0°C активность уменьшается на 92-97%. В большинстве случаев выявленные эффекты достоверны ( $p \leq 0.001$ ).

Данные, касающиеся раздельного действия перечисленных факторов на ферментативную активность протеиназ, функционирующих как в желудке, так и в кишечнике рыб, согласуются с полученными ранее (Кузьмина, 1990б, 2005; Уголев, Кузьмина, 1993; El-Shemy, Levin, 1997; Alarcón et al., 1998; Неваленый и др., 2003; Muñoz, 2004; Кузьмина и др., 2005; Bezerra et al., 2005). Также подтверждена значительная устойчивость протеиназ желудка типичных и факультативных ихтиофагов к действию температуры (Кузьмина, 1990б, 2005; Уголев, Кузьмина, 1993; Пономарев, 1995; Munilla-Morán, Saborido-Rey, 1996). Полученные результаты свидетельствуют о том, что медь в большей степени ингибирует активность всех исследованных протеиназ по сравнению с цинком, что объясняется особенностями неспецифических взаимодействий ионов этих металлов с белками (Неорганическая биохимия, 1978). Особо следует отметить выявленные в работе значительные видовые различия в действии тяжелых металлов на активность протеиназ слизистой оболочки кишечника рыб. Последнее может быть связано с влиянием pH на присоединение ионов металлов к тем или иным участкам связывания в молекуле белка (Неорганическая биохимия, 1978). Однако наиболее вероятно, что эффекты pH обусловлены изменением формы существования металлов в зависимости от концентрации ионов водорода (Spear, 1981; Campbell, Stokes, 1985).

Увеличение значений pH, приводящее к снижению активности протеиназ желудка и повышению активности ферментов кишечника, может быть связано с тем, что у большинства видов рыб пепсин представлен рядом изоформ, различающихся оптимумами pH (Noda, Murakami, 1981; Gildberg, 1988; Ulitina, Proskuryakov, 2004). Разный характер изменения активности протеиназ кишечника у рыб разных видов в зоне кислых значений pH может быть обусловлен относительно высокой активностью лизосомальных катепсинов и их разным соотношением в слизистой оболочке (Немова, 1996; Ashie, Simpson, 1997; Немова, Высоцкая, 2004). Вариабельность полифакторных эффектов у рыб разных видов, по всей вероятности, обусловлена доминированием тех или иных механизмов.

#### **Глава 4. Раздельное и комплексное влияние ионов тяжелых металлов (цинк, медь), температуры и pH на активность протеиназ целого организма потенциальных объектов питания рыб**

Активность протеиназ целого организма потенциальных жертв рыб при стандартных условиях. Уровень активности протеиназ целого организма потенциальных объектов питания рыб в расчете на 1г сырой массы ткани, как правило, значительно ниже активности протеиназ слизистой оболочки пищеварительного тракта рыб (табл. 2). Минимальный уровень протеолитической активности отмечен в целом организме жертв рыб-бентофагов (моллюски, олигохеты, личинки хирономид). Максимальные значения активности протеиназ обнаружены при исследовании

Таблица 2. Уровень активности протеиназ целого организма беспозвоночных и молоди рыб при температуре 20°C и pH 7.4.

Консумент	Потенциальные объекты питания рыб	Активность протеиназ по казеину, мкмоль/(г·мин)	Активность протеиназ по гемоглобину, мкмоль/(г·мин)
Планктофаги	Зоопланктон	1.50 ± 0.04	2.48 ± 0.08
	<i>Daphnia longispina</i>	0.68 ± 0.04	3.30 ± 0.07
Бентофаги	Личинки хирономид	0.22 ± 0.01	2.56 ± 0.05
	<i>Chironomus riparius</i>	следы	1.35 ± 0.04
	Олигохеты	0.48 ± 0.05	1.34 ± 0.06
	Катушка	следы	0.26 ± 0.04
	Прудовик	следы	0.96 ± 0.03
	Дрейссена	следы	1.07 ± 0.06
Ихтиофаги	Тюлька	0.37 ± 0.04	1.48 ± 0.05
	Окунь	1.39 ± 0.07	2.35 ± 0.08
	Ерш	0.92 ± 0.06	1.07 ± 0.05
	Плотва	1.01 ± 0.03	0.89 ± 0.03
	Карп	0.22 ± 0.03	0.43 ± 0.03
	Сеголетки рыб сем. карповых	0.72 ± 0.04	0.83 ± 0.03

Примечание. Представлены средние и ошибки средних ( $M \pm m$ ). Количество исследованных особей составило 5-30 для личинок хирономид, моллюсков и молоди рыб, до нескольких сотен для зоопланктона и олигохет.

представителей зоопланктона. При этом у большинства исследованных видов беспозвоночных и рыб уровень активности протеиназ по гемоглобину несколько выше такового по казеину, что хорошо согласуется с данными литературы. Известно, что у молоди ряда видов рыб (Chakrabarti et al., 2006; Suzer et al., 2006) и беспозвоночных (Reid, Räucher, 1972, 1976; Bruto et al., 2001; Kumar et al., 2005) активность химотрипсиноподобных протеиназ выше, чем активность трипсиноподобных протеиназ. Помимо сериновых протеиназ в процессах пищеварения у беспозвоночных (Reid, 1977; Vonk, Western, 1984; Gildberg, 1988; Мухин, 1998; Hu, Leung, 2007) и безжелудочных рыб (Кароор et al., 1975; Jany, 1976; Gildberg, 1988) участвуют различные лизосомальные гидролазы (катепсины), выполняющие функции отсутствующего у них пепсина, а также ряд специфических протеиназ (Peaucellier, 1983; Guionie et al., 2003). Установлено, что и сериновые протеиназы, и катепсины имеют широкий спектр действия. Наибольший вклад в гидролиз казеина наряду с трипсином вносят катепсины D и E, гемоглобина – химотрипсин и катепсины D, E, A и G (Немова, 1978; Панин, Маянская, 1987).

Раздельное и комплексное влияние температуры, рН и тяжелых металлов на активность казеинлитических протеиназ целого организма рыб. При снижении температуры от 20°C до 0°C при рН 7.4 уровень активности протеиназ у большинства видов рыб снижается в 2-3 раза (рис.3а). Влияние рН на ферментативную активность у разных рыб видов различно: при рН 5.0 (20°C) у плотвы, сеголеток карповых рыб и ерша активность ниже, чем при рН 7.4, у остальных видов выше (в обоих случаях в пределах 2 раз). В присутствии тяжелых металлов активность ферментов уменьшается в 1.5-2.5 раза. При комплексном действии температуры 0°C и рН 5.0 наблюдается разная степень снижения уровня казеинлитических протеиназ. Если у сеголеток карповых рыб активность снижается до 0, у плотвы – в 5 раз, то у карпа она практически не изменяется. При температуре 0°C и щелочных значениях рН в большинстве случаев степень уменьшения активности ферментов существенно ниже, чем при кислых значениях. Во всех указанных случаях изменения активности протеиназ достоверны (преимущественно  $p \leq 0.01$ ). При комплексном действии ионов металлов и температуры 0°C активность протеиназ у всех видов рыб понижается значительно (в присутствии цинка в 3-9 раз, меди – в 5.5-35 раз). Однако комплексные эффекты достоверны лишь в некоторых случаях.

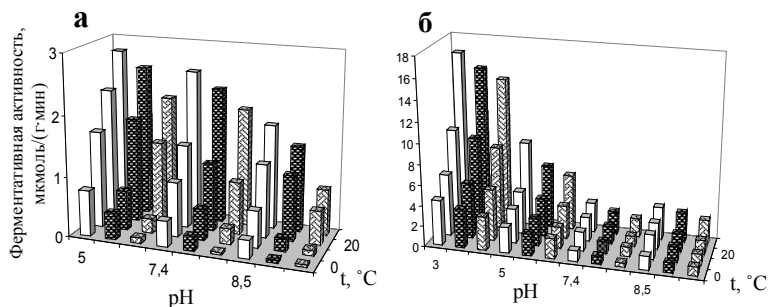


Рис. 3. Влияние температуры, рН, ионов меди и цинка на активность протеиназ целого организма молоди окуня по казеину (а) и гемоглобину (б).

Раздельное и комплексное влияние температуры, рН и тяжелых металлов на активность гемоглобинлитических протеиназ целого организма рыб. Гемоглобинлитическая активность под влиянием низких значений рН (3.0) повышается в 1.5-7.5 раз относительно показателей при рН 7.4 (рис. 3б). В зоне щелочных значений рН отмечено незначительное увеличение активности ферментов. Эффекты низкой температуры и тяжелых металлов на гемоглобинлитическую активность целого организма рыб близки: активность снижается в пределах 2.5 раз. Следует отметить, что понижение температуры до 0°C, как правило, приводит к усилению негативных эффектов тяжелых

металлов. Вместе с тем у тюльки, окуня и сеголеток карповых рыб при смещении рН до 3.0 наблюдается некоторое уменьшение ингибирующего действия цинка и меди на активность протеиназ. Наименее устойчивы к действию ионов цинка и меди при всех значениях рН протеиназы плотвы. Поскольку рН в ряде случаев оказывает противоположное влияние на активность протеиназ по гемоглобину, комплексное действие исследованных факторов на ферменты рыб разных видов различно. Так, при рН 3.0 и температуре 0°C активность протеиназ у плотвы и ерша снижается соответственно в 1.5 и 2.5 раза, у остальных видов увеличивается в 1.5-2 раза. Комплексное действие низкой температуры и тяжелых металлов приводит к снижению активности протеиназ в 2-6 раза. При совместном действии всех исследованных факторов отмеченные выше ингибиторные эффекты в ряде случаев усиливаются, в ряде случаев ослабляются. При этом наблюдается тенденция уменьшения достоверности различий от моно- к би- и полифакторным воздействиям.

Раздельное и комплексное влияние температуры, рН и тяжелых металлов на активность казеинлитических протеиназ у представителей разных таксонов беспозвоночных. Степень снижения ферментативной активности у разных видов беспозвоночных при понижении температуры до 0°C (рН 7.4), рН до 5.0 (20°C) значительно варьирует (25-85%). Смещение рН в сторону щелочных значений (до 8.5, температура 20°C) оказывает на активность протеиназ целого организма беспозвоночных разнонаправленное действие: у представителей зоопланктона активность снижается на 15%, у хирономид и олигохет, напротив, увеличивается приблизительно на 60%. Эффекты тяжелых металлов на протеолитическую активность у всех исследованных видов относительно близки. При температуре 0°C или рН 5.0 активность протеиназ в присутствии ионов цинка и меди полностью подавляется. При повышении рН до нейтральных и слабощелочных значений независимо от температуры наблюдается последовательное ослабление ингибирующего действия ионов металлов. Наиболее устойчивы к действию цинка и меди протеиназы планктонных рачков. Несмотря на существенные различия в степени раздельного влияния температуры и рН, при их комплексном действии негативный эффект усиливается, особенно при температуре 0°C и рН 5.0, но его вариабельность уменьшается (активность у всех видов достоверно ( $p \leq 0.001$ ) снижается на 90-98%). При сочетанном действии низкой температуры и тяжелых металлов, а также низкой температуры, кислых значений рН и тяжелых металлов у всех исследованных беспозвоночных отмечаются лишь следовые значения активности протеиназ.

Раздельное и комплексное влияние температуры, рН и тяжелых металлов на активность гемоглобинлитических протеиназ у представителей разных таксонов беспозвоночных. Уровень протеолитической активности при температуре 0°C в наибольшей степени снижается по сравнению с таковым

при 20°C у личинок *Ch. riparius* (на 90%), в наименьшей – у олигохет (на 25%). Под влиянием кислых значений pH (3.0) гемоглоблилитическая активность у разных видов животных изменяется разнонаправлено: у *D. longispina* и личинок *Ch. riparius* активность уменьшается приблизительно на 50%, у большинства беспозвоночных гидробионтов незначительно повышается, у катушки увеличивается на 400%. В зоне щелочных значений pH отмечено как снижение (прудовик), так и увеличение активности протеиназ (наиболее значительное у олигохет – на 40%). Степень снижения активности ферментов под действием цинка колеблется от 8% до 50%, под действием меди – от 10% до 65%. Интересно, что из всех исследованных видов беспозвоночных протеиназы *D. longispina* наиболее устойчивы к действию ионов цинка, но наименее устойчивы к действию ионов меди. Для протеиназ беспозвоночных, гидролизующих гемоглобин, сохраняется описанная выше закономерность: эффекты металлов усиливаются при снижении температуры. Однако при комплексном действии низкой температуры и кислых значений pH ингибиторные эффекты тяжелых металлов, как правило, ослабляются. Так, при температуре 0°C и pH 3.0 в присутствии ионов металлов активность полностью подавляется только у *Ch. riparius*, у остальных животных в присутствии цинка ферментативная активность снижается в пределах 10-90%, в присутствии меди – в пределах 15-95%. Описанные эффекты в большинстве случаев достоверны ( $p \leq 0.01$ ).

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что разная степень негативного действия тяжелых металлов на активность протеиназ в целом организме животных может быть обусловлена не только выше указанными механизмами, но и разным содержанием металлов в тканях гидробионтов, относящихся к разным таксонам (Соболев, 2006). Важно отметить, что при температурах близких к 0°C активность протеиназ целого организма потенциальных жертв рыб как по казеину, так и по гемоглобину снижается в меньшей степени, чем активность гидролаз консументов. Разная степень снижения ферментативной активности под влиянием низкой температуры может быть обусловлена не только ее прямым действием на белковую глобулу ферментов, но и разным спектром протеиназ, а также соотношением их изозимных форм. Последнее может зависеть как от видовых особенностей, так и от стадии развития животных (Evans, Ford, 1976). Разный характер влияния концентрации протонов на активность протеиназ потенциальных жертв, по всей вероятности, связан с разным соотношением в исследованных препаратах различных лизосомальных гидролаз, ферментов пищеварительного тракта, а также других органов и тканей. В связи с этим комплексное влияние температуры и pH следует рассматривать не как би- и полифакторное воздействие, а как действие температуры и ионов металлов на разные гидролазы. Учитывая разные оптимумы pH конкретных катепсинов при исследованных значениях pH

могли функционировать разные ферменты: при pH 3.0 – катепсины D, E и N, при pH 5.0 – C, D, H и S, при pH 7.0 – B, L и H (Немова, 1978; Антонов, 1983; Ashie, Simpson, 1997). При нейтральных и щелочных значениях pH, помимо пищеварительных гидролаз, могут функционировать ферменты микробиоты, населяющей организмы гидробионтов (Лубьянскене и др., 1989; Шивокене, 1989; Кузьмина, Скворцова, 2002). По всей вероятности, различные эффекты pH в значительной мере обусловлены разным соотношением протеиназ у гидробионтов разных видов.

### **Глава 5. Влияние ионов тяжелых металлов на температурные характеристики протеиназ консумента и жертвы (на примере тюльки *Clupeonella cultriventris* (Nordmann)).**

Температурные характеристики протеиназ пищеварительного тракта и целого организма тюльки. Активность протеиназ, функционирующих в пищеварительном тракте и целом организме тюльки представлена в табл. 3. При температурах выше оптимальных, при 60°C и, особенно, 70°C наблюдается последовательное снижение активности всех исследованных протеиназ. В зоне постмаксимальных температур активность протеиназ кишечника и химуса по гемоглобину снижается значительно, чем таковая по казеину. Термостабильность протеиназ химуса несколько выше, чем ферментов желудка, кишечника, а также целого организма тюльки.

Таблица 3. Активность протеиназ пищеварительного тракта и целого организма тюльки при температуре 0°C и в зоне температурного оптимума ( $t_{\text{опт}}$ ).

Субстрат и значение pH	Активность при температуре 0°C мкмоль / (г·мин)	Активность в зоне $t_{\text{опт}}$ мкмоль / (г·мин)	Температурный оптимум, °C
<b>Желудок</b>			
Гемоглобин, pH 3.0	2.41±0.13	6.08±0.16	50
Гемоглобин, pH 5.0	0.54±0.08	3.57±0.05	50
Казеин, pH 5.0	0.27±0.03	3.04±0.11	50
<b>Кишечник</b>			
Гемоглобин, pH 7.4	0.98±0.06	4.73±0.06	40
Казеин, pH 7.4	3.29±0.08	10.52±0.18	40
<b>Химус</b>			
Гемоглобин, pH 7.4	1.61±0.10	4.46±0.16	50
Казеин, pH 7.4	3.52±0.25	9.64±0.16	50
<b>Целый организм</b>			
Гемоглобин, pH 3.0	1.31±0.10	4.79±0.13	40
Гемоглобин, pH 5.0	0.21±0.03	2.38±0.05	50
Казеин, pH 5.0	0.19±0.02	2.13±0.04	40

Данные по энергии активации свидетельствуют о том, что в большинстве случаев в зоне низких температур (0-10°C) величины этого показателя значительно выше (эффективность процесса ниже), чем в зоне более высоких температур. Минимальные значения этого параметра в диапазоне температур жизнедеятельности отмечены для пепсиноподобных протеиназ желудка при pH 3.0 (3.1 ккал/моль в диапазоне температур 10-20°C), максимальные – для гемоглоблинитических протеиназ целого организма тюльки при pH 5.0 (11.7 ккал/моль в диапазоне температур 0-10°C). Гемоглоблинитические протеиназы химуса более эффективны по сравнению с другими рассмотренными ферментами во всем диапазоне температур жизнедеятельности тюльки.

Влияние ионов тяжелых металлов на температурные характеристики протеиназ тюльки. Тяжелые металлы при изменении температуры разнонаправленно влияют на скорость ферментативной реакции. В ряде случаев значения  $Q_{10}$  в присутствии тяжелых металлов незначительно снижаются, в большинстве случаев увеличиваются. Наиболее значительное повышение значений  $Q_{10}$  в присутствии ионов обоих металлов отмечено для протеиназ химуса (в диапазоне 0-10 и 10-20°C), а также в присутствии ионов меди для гемоглоблинитических протеиназ желудка (в диапазоне 0-10°C) и целого организма (в диапазоне 10-20°C) и для казеинлитических протеиназ целого организма тюльки (диапазоне 0-10°C).

В зоне температурного оптимума (50°C) активность пепсиноподобных протеиназ желудка при pH 3.0 в присутствии ионов цинка и меди снижается приблизительно на 20%, при pH 5.0 – на 65%. При этом под действием ионов металлов величина температурного оптимума смещается на 10°C и соответствует 40°C. Наибольшее уменьшение относительной активности отмечено в зоне постмаксимальных температур (рис. 4).

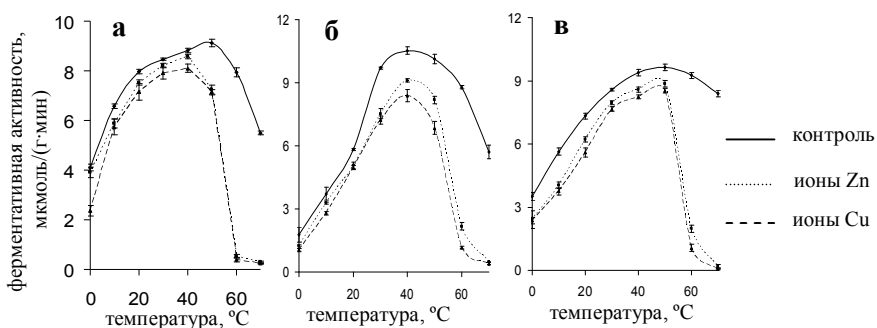


Рис. 4. Влияние температуры и ионов цинка и меди на активность пепсиноподобных протеиназ желудка (а), трипсиноподобных протеиназ кишечника (б) и химуса (в) тюльки

Под действием ионов металлов форма кривой температурной зависимости протеиназ кишечника изменяется менее значительно по сравнению с таковыми протеиназ желудка, особенно в случае активности по гемоглобину. Отмечено сужение зоны температурного оптимума трипсиноподобных протеиназ (рис. 4) и большее снижение их относительной активности в зоне постмаксимальных температур по сравнению с химотрипсиноподобными протеиназами. При температуре 40°C активность протеиназ кишечника снижается на 10-20%. В присутствии ионов металлов наблюдается более значительное снижение активности протеиназ химуса в зоне температур жизнедеятельности вида и постмаксимальных температур. В присутствии ионов обоих металлов существенно уменьшается активность протеиназ целого организма тюльки в зоне температурного оптимума. Максимальное снижение отмечено в случае гемоглоблинитических протеиназ целого организма при pH 5.0 (под влиянием цинка – 45, меди – 65%). Кроме того, значение их температурного оптимума снижается до 40°C.

Данные, касающиеся энергии активации ( $E_{\text{акт}}$ ), свидетельствуют о том, что в большинстве случаев в присутствии металлов изменяются не только величины  $E_{\text{акт}}$ , но и температура точки перегиба кривой на графике Аррениуса.  $E_{\text{акт}}$  протеиназ желудка в присутствии цинка в зоне 0°-10°C изменяется незначительно, в зоне более высоких температур увеличивается до 12 раз. Значения параметра протеиназ кишечника в присутствии ионов металлов во всех случаях увеличиваются. Особо следует подчеркнуть, что  $E_{\text{акт}}$  трипсино- и химотрипсиноподобных протеиназ химуса в присутствии металлов не изменяется в диапазоне температур жизнедеятельности. Поскольку  $E_{\text{акт}}$  отражает минимальную энергию, необходимую для вступления молекул реагирующих веществ в реакцию, увеличение этого параметра свидетельствует о большей энергоёмкости процесса. Следовательно, присутствие металлов, вызывающее в абсолютном большинстве случаев повышение значений  $E_{\text{акт}}$ , существенно ухудшает характеристики протеиназ.

Сопоставление полученных и имеющихся в литературе данных показало, что температурные характеристики протеиназ пищеварительного тракта тюльки близки таковым у других видов рыб (Kaláč, 1978a; Ásgeirsson et al., 1989; Кузьмина, 1990б; Уголев, Кузьмина, 1993 El-Shemy, Levin, 1997; Pavlisko et al., 1999). При этом температурный оптимум пепсиноподобных протеиназ у тюльки ниже, чем у других видов рыб, обитающих в Рыбинском водохранилище (Кузьмина, 1990б; Уголев, Кузьмина, 1993). Однако у дальневосточной сардины *Sardinops melanosticta*, близкой в систематическом отношении тюлке, выявлены две формы пепсина с температурным оптимумом 40 и 55°C (Noda, Murakami, 1981). Вероятно, у тюльки, так же как и у сардины, имеется две молекулярные формы этого фермента, но доминирует первая. Сведения о влиянии ионов металлов на температурные характеристики пищеварительных протеиназ в доступной литературе

отсутствуют. Однако известно, что при стрессировании формалином плотвы оптимум щелочной фосфатазы также смещается от 50°C (в контроле) до 40°C, сужается зона оптимальных значений температуры и уменьшается термостабильность ферментов (Кузьмина, Таликина, 1998).

Таким образом, достаточно высокий уровень активности протеиназ слизистой оболочки желудка, обеспечивающих начальные этапы гидролиза белковых компонентов пищи, а также низкие величины  $E_{акт}$  протеиназ позволяют тюльке, будучи консументом, активно питаться при низких температурах. В то же время, свойства ферментов тюльки как потенциальной жертвы рыбоядных видов способствуют эффективному питанию последних. Однако тяжелые металлы негативно влияют на исследованные характеристики протеиназ.

### **Заключение**

Ионы цинка и меди в концентрации 10 мг/л, встречающейся в объектах питания рыб и являющейся для обоих металлов допустимой остаточной концентрацией, а также низкая температура и значения pH, лежащие за пределами оптимальных, негативно влияют на активность протеиназ трофических партнеров. Ранее, как правило, исследовались отдельные эффекты температуры, pH и ионов тяжелых металлов на активность протеолитических ферментов пищеварительного тракта рыб. В случае ферментов кишечника в большинстве случаев изучали казеинлитические, преимущественно трипсиноподобные протеиназы. Нами впервые показано, что трипсиноподобные протеиназы рыб менее устойчивы к действию температуры и pH по сравнению с гемоглобинлитическими (преимущественно хомотрипсиноподобными) протеиназами.

Проведенное нами исследование установило, что активность ферментов, функционирующих в целом организме потенциальных жертв рыб, как правило, значительно ниже активности протеиназ слизистой оболочки пищеварительного тракта рыб. Впервые продемонстрировано, что протеиназы целого организма потенциальных жертв, гидролизующие казеин, в большей степени подвержены негативному действию низких температур, чем протеиназы, гидролизующие гемоглобин. При изучении влияния pH на ферментные системы целого организма рыб и беспозвоночных выявлены значительные межвидовые различия. При изменении pH как в сторону кислых, так и в сторону щелочных значений у ряда видов рыб и беспозвоночных наблюдается повышение активности протеиназ, у некоторых видов – снижение. Выказано предположение о том, что разнонаправленное действие pH на ферментативную активность потенциальных объектов питания рыб обусловлено разным набором и соотношением изоформ протеолитических ферментов в их тканях.

На примере тюльки – вида, играющего в экосистеме роль консумента и жертвы, установлено, что ионы цинка и меди существенно влияют не только

на активность, но и на свойства, в частности температурные характеристики ферментов пищеварительного тракта и целого организма рыб.

Впервые исследовано комплексное влияние ионов тяжелых металлов, температуры и pH на активность протеиназ пищеварительного тракта рыб и целого организма их потенциальных объектов питания. Установлено, что комплексное действие исследуемых факторов на активность протеиназ, функционирующих в слизистой оболочке пищеварительного тракта рыб, а также в целом организме их объектов питания, существенно отличается от раздельных эффектов тех же факторов. Важно, что эффекты ионов цинка и меди на активность протеиназ зависят от параметров среды, прежде всего, температуры и концентрации водородных ионов. При этом у всех исследованных видов гидробионтов в присутствии ионов меди активность протеиназ снижается значительно, чем в присутствии ионов цинка. Наиболее существенное снижение активности протеиназ трофических партнеров наблюдается при комбинированном действии ионов тяжелых металлов, низкой температуры и значений pH, лежащих за пределами оптимальных. Результаты опытов позволяют предположить, что степень воздействия ионов цинка и меди на гидролиз белков в пищеварительном тракте рыб зависит не только от структуры субстрата, структуры и свойств ферментов, синтезируемых консументами, но и от аналогичных характеристик гидролаз их потенциальных жертв. Поскольку белки являются одними из основных компонентов пищи исследованных видов рыб, снижение активности протеиназ в присутствии ионов цинка и меди может ухудшать усвоение кормов и, как следствие, эффективность питания, влияющую на размерно-весовые характеристики и темп роста рыб.

Полученные результаты подтверждают высказываемые в последние годы пожелания при разработке новых требований к ограничению количества загрязняющих веществ в окружающей среде учитывать трофический статус экосистем, сезонные особенности природных факторов, специфику функционирования водных экосистем в различных природно-климатических зонах и другие условия (Фруммин, 2000; Левич и др., 2008). При этом лишь оценка комплексного воздействия природных и антропогенных факторов на эффективность функционирования пищеварительной и других систем рыб разных видов может приблизить к пониманию механизмов устойчивости ихтиоценозов.

## **ВЫВОДЫ**

1. Активность протеиназ слизистой оболочки пищеварительного тракта рыб, как правило, в 1.5-2 раза выше активности протеиназ целого организма их потенциальных объектов питания. Наибольший уровень активности характерен для гемоглобинлитических (пепсиноподобных) протеиназ слизистой оболочки желудка рыб. Активность

казеинлитических (трипсиноподобных) протеиназ слизистой оболочки кишечника рыб в 1.5-3 раза ниже таковой пепсиноподобных, но в 1.5-5 раза выше активности гемоглобинлитических (химотрипсиноподобных) протеиназ кишечника. В целом организме гидробионтов активность казеинлитических (предположительно катепсины E, D) протеиназ, напротив, 1.2-5 раза ниже таковой гемоглобинлитических протеиназ (предположительно катепсины D, E, A, G).

2. Ионы тяжелых металлов (цинк и медь), температура и pH слабо влияют на активность пепсиноподобных протеиназ желудка рыб: в большинстве случаев изменения активности не превышают 20%. Температура и pH в большей степени действуют на активность протеиназ кишечника консументов и целого организма жертв по сравнению с ионами тяжелых металлов. Эффекты ионов цинка и меди зависят от температуры и pH: снижение температуры усиливает ингибирующее действие ионов тяжелых металлов, смещение pH в сторону щелочных значений, напротив, ослабляет. Ионы меди обладают большей токсичностью, чем ионы цинка.
3. Максимальное снижение активности протеиназ пищеварительного тракта рыб, независимо от типа питания, наблюдается при комплексном действии ионов тяжелых металлов, температуры 0°C и pH 5.0. Степень снижения активности значительно варьирует в зависимости от вида рыб. Наиболее устойчивы пепсиноподобные протеиназы желудка (активность обычно уменьшается на 40-70%), наименее – трипсиноподобные протеиназы кишечника рыб (активность снижается на 70-98%).
4. Активность протеиназ целого организма потенциальных объектов питания ихтиофагов при смещении pH в сторону кислых значений, как правило, увеличивается, планкто- и бентофагов – снижается. Комплексное действие температуры, pH и ионов тяжелых металлов на активность протеиназ целого организма потенциальных объектов питания рыб в значительной мере зависит от вида гидробионтов.
5. На примере тюльки показана возможность влияния ионов тяжелых металлов на температурные характеристики протеиназ. В присутствии цинка и меди снижается термостабильность, смещается температурный оптимум пепсиноподобных протеиназ (от 50°C до 40°C), сужается зона оптимальных значений температур, значения энергии активации ферментов в зоне температур жизнедеятельности повышаются в 2–4 раза, что свидетельствует о снижении интенсивности гидролиза белковых компонентов пищи.
6. Присутствие ионов тяжелых металлов (цинк и медь) усугубляет негативное действие низкой температуры и в ряде случаев pH на процесс гидролиза белковых компонентов как у консументов, так и у их потенциальных жертв, что снижает эффективность питания и может привести к изменению темпа роста рыб.

### Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Кузьмина В.В., Ботяжова О.А., Корюкаева Н.В., Наумова М.А., Ветрова М.И., Шишин М.М. Влияние цинка и меди на активность протеиназ, функционирующих в пищеварительном тракте и в водной среде // Экологические проблемы уникальных природных и антропогенных ландшафтов. Ярославль. 2004. С. 223-228.
2. Кузьмина В.В., Корюкаева Н.В., Шишин М.М. Сравнительный анализ влияния меди и цинка на активность протеиназ рыб и их объектов питания // Матер. Межд. конф.: «Современные проблемы водной токсикологии». Борок. 2005. С. 76-77.
3. Кузьмина В.В., Шишин М.М., Корюкаева Н.В., Наумова М.А., Ботяжова О.А. Влияние цинка и меди на активность протеиназ пищеварительного тракта у ряда видов пресноводных костистых рыб // Биол. внутр. вод. 2005. №4. С.102-109.
4. Кузьмина В.В., Корюкаева Н.В. Влияние природных и антропогенных факторов на активность протеиназ трофических партнеров // Тез. Всерос. конф. «Механизмы функционирования висцеральных систем». СПб. 2005. С. 132-133.
5. Корюкаева Н.В., Наумова М.А., Кузьмина В.В. Влияние цинка и меди на активность протеиназ объектов питания рыб-бенто- и планктофагов // Современные проблемы биологии, экологии, химии: Региональный сборник научных трудов. Ярославль. 2005. С.97-103.
6. Кузьмина В.В., Корюкаева Н.В. Раздельное и сочетанное влияние температуры, рН и тяжелых металлов (медь, цинк) на активность протеиназ слизистой оболочки пищеварительного тракта рыб // Тез. Всерос. конф. с межд. участ.: «Актуальные проблемы физиологии пищеварения и питания». СПб. 2006. С.56.
7. Кузьмина В.В., Корюкаева Н.В. Влияние температуры на активность протеиназ пищеварительного тракта рыб и их потенциальных жертв // Тез. XIII Межд. совещ. по эволюц. физиол. памяти Л.А.Орбели. СПб. 2006. С. 125-126
8. Кузьмина В.В., Ушакова Н.В. Влияние тяжелых металлов на вклад протеиназ потенциальной жертвы в процессы пищеварения рыб // Тез. Всерос. конф. с межд. участ.: «Механизмы функционирования висцеральных систем». СПб. 2007. С.168-169.
9. Кузьмина В.В., Ушакова Н.В. Роль пищеварительной системы в неспецифической защите рыб. Влияние температуры и тяжелых металлов на активность протеиназ пищеварительного тракта // Матер. Межд. конф.: «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов – 2». Борок. 2007. С.45-50.
10. Кузьмина В.В., Ушакова Н.В. Температурные характеристики протеиназ только *Clupeonella cultriventris* Nordmann, способствующие расширению северных границ ее ареала // Матер. Межд. конф.: «Естественные и

- инвазионные процессы формирования разнообразия водных и наземных экосистем». Ростов-на-Дону. 2007. С.178-179.
11. Кузьмина В.В., Ушакова Н.В. Влияние температуры, рН и тяжелых металлов (медь, цинк) на активность протеиназ рыб и их потенциальных объектов питания // Тез. Науч. конф. с участ. стран СНГ: «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов». Петрозаводск. 2007. С.80-81.
  12. Кузьмина В.В., Ушакова Н.В. Влияние температуры, рН и тяжелых металлов на активность протеиназ слизи оболочки пищеварительного тракта рыб бенто- и планктофагов // Биол. внутр. вод. 2007. №4. С.88-96.
  13. Кузьмина В.В., Ушакова Н.В. Влияние температуры, рН и тяжелых металлов (медь, цинк) на активность протеиназ слизи оболочки пищеварительного тракта типичных и факультативных ихтиофагов // Ворп. ихтиол. 2007. Т.47. №4. С.566-573.
  14. Кузьмина В.В., Ушакова Н.В. Влияние температуры, рН и тяжелых металлов (медь, цинк) на активность протеиназ потенциальных объектов питания типичных и факультативных ихтиофагов // Ворп. ихтиол. 2007. Т.47. №6. С.837-846.
  15. Кузьмина В.В., Ушакова Н.В. Активность протеиназ у беспозвоночных животных – потенциальных объектов питания рыб. Влияние температуры, рН и тяжелых металлов // Журн. эвол. биохим. физиол. 2007. Т.43. №5. С.404-409.
  16. Кузьмина В.В., Ушакова Н.В. Процесс экзотрофии у рыб. Влияние тяжелых металлов (Zn, Cu) // Журн. эвол. биохим. физиол. 2008. Т.44. №4. С.365-372.
  17. Ушакова Н.В., Кузьмина В.В. Влияние тяжелых металлов на активность протеиназ пищеварительного тракта рыб и их потенциальных жертв в диапазоне температур жизнедеятельности // Тез. Всерос. конф. с межд. участ.: «Механизмы функционирования висцеральных систем». СПб. 2008. С.208.
  18. Кузьмина В.В., Ушакова Н.В. 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. 2008. С.59-62.
  19. Ушакова Н.В. Влияние меди и цинка на активность протеиназ слизи оболочки желудочно-кишечного тракта рыб-ихтиофагов и целого организма их потенциальных объектов питания // Вопросы физиологии и водной токсикологии. Ярославль. 2008. С.113-119.