

**ФИЛИПШОВ**

**Андрей Андреевич**

**Влияние органических загрязнителей на активность гликозидаз  
в кишечнике сеголетков плотвы *Rutilus rutilus* (L.).**

**Специальность 03.02.08 – экология (биология)**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Борок – 2011**

Работа выполнена в Учреждении Российской Академии Наук Институте биологии  
внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

**Научный руководитель:** доктор биологических наук  
**Голованова Ирина Леонидовна**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Шатуновский Михаил Ильич**

доктор биологических наук  
**Извекова Галина Игоревна**

**Ведущая организация:** Учреждение Российской Академии Наук Институт биологии  
Карельского научного центра РАН

Защита диссертации состоится 14 июня 2011 г. в 10 часов на заседании диссертационного  
совета ДМ 002.036.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии  
внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН по адресу: 152742 Ярославская обл., Некоузский р-н,  
п. Борок, тел./факс (48547) 24042.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук  
Института биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН и в сети Интернет на сайте  
<http://www.ibiw.ru>

Автореферат разослан 4 мая 2011г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук



Л.Г. Корнева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Загрязнение окружающей среды по-прежнему остается одной из наиболее важных экологических проблем. В рыбохозяйственные водоемы поступает до 300 тыс. вредных веществ, многие из которых обладают биологической активностью и способны накапливаться в тканях гидробионтов (Влияние..., 1990; Лукьяненко, 1992; Токсикозы рыб..., 2006). В их число входят приоритетные загрязнители как органической (полихлорированные бифенилы, фосфорорганические пестициды), так и неорганической (тяжелые металлы) природы.

Полихлорированные бифенилы (ПХБ), относящиеся к классу хлорорганических полициклических ароматических соединений, – одна из самых распространенных групп стойких органических загрязнителей. Даже в крайне малых дозах они оказывают токсическое, мутагенное и канцерогенное действие (Niimi, 1996; Изюмов и др., 2004). Хлорофос, фосфорорганический пестицид с нервнопаралитическим действием, ранее применявшийся для борьбы с эктопаразитами рыб, нарушает нормальную функцию различных органов и систем, изменяет поведение, темп роста и развития рыб (Глубоков, 1990; Ferrando et al., 1991; Pavlov et al., 1992; Таликина и др., 2003, 2005).

Ряд соединений, попадающих в водоёмы, могут обладать мутагенной активностью. Для изучения возможных последствий необходимо использовать вещества с хорошо известным действием. Например, N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (MNNG) – генотоксикант с прямым влиянием на химическую структуру ДНК, широко применяемый в работах по индуцированию канцерогенеза у рыб (Marty et al., 1990; Hendricks et al., 1995; Amanuma et al., 2004). Установлено, что он вызывает многочисленные новообразования в различных, в том числе и пищеварительных органах ряда видов рыб (Park et al., 1993; Hendricks et al., 1995; Orner et al., 1996; Carlson et al., 2001). Однако его действие на пищеварительную функцию рыб ранее не исследовалось.

Наряду с органическими ксенобиотиками важнейшее место в загрязнении водных экосистем принадлежит тяжелым металлам, которые не подвергаются трансформации в организме гидробионтов, крайне медленно покидая биологический цикл (Алабастер, Ллойд, 1984; Решетников, Шагуновский, 1997; Перевозников, Богданова, 1999; Немова, Высоцкая, 2004; Моисеенко, 2009; Boyd, 2010). Даже необходимые микроэлементы, такие как медь и цинк (Watanabe et al., 1997; Остроумова, 2001), в высоких концентрациях становятся токсичными (Алабастер, Ллойд, 1984). Попадая в организм с водой и/или пищей (Bury et al., 2003), они могут оказывать прямое и опосредованное влияние на морфофункциональные характеристики пищеварительного тракта рыб (Неваленный и др., 2003; Кузьмина и др., 2004; Голованова, 2008). Чувствительность пищеварительных ферментов рыб к действию тяжелых металлов зависит от

ряда биотических (возраст, физиологическое состояние) и абиотических (температура и кислотность среды) факторов (Голованова, 2004).

Особый интерес представляют отдаленные последствия действия токсических агентов в зародышевый период, поскольку у большинства видов рыб все стадии эмбриогенеза протекают во внешней среде и прямое действие повреждающих факторов возможно уже на самых ранних этапах индивидуального развития. Несмотря на пристальное внимание к изучению действия антропогенных факторов на различные аспекты жизнедеятельности гидробионтов, данные по влиянию органических загрязнителей на пищеварительные гидролазы рыб в достаточной мере фрагментарны (Бузинова, 1983; Golovanova et al., 1994, 1999; Кузьмина, Таликина, 1998; Kuz'mina et al., 1999). При этом действие органических загрязнителей на гидролиз углеводов, играющих важную роль в энергетическом и пластическом обмене организма, у молоди плотвы ранее не исследовалось.

**Цель работы:** изучить влияние *in vivo* органических токсикантов (ПХБ, хлорофос, MNNG) на активность гликозидаз, их чувствительность к действию ионов меди и цинка, и кинетические характеристики гидролиза углеводов в кишечнике сеголетков плотвы *Rutilus rutilus* (L.).

**Задачи исследования:**

1. Изучить влияние ПХБ, присутствующих в корме и грунте, на активность гликозидаз и кинетические характеристики гидролиза углеводов в кишечнике сеголетков плотвы.
2. Выявить отдаленные последствия действия низких концентраций хлорофоса и MNNG в период эмбриогенеза на активность гликозидаз и кинетические характеристики гидролиза углеводов в кишечнике развивающихся сеголетков плотвы.
3. Оценить влияние органических токсикантов на чувствительность гликозидаз сеголетков плотвы к действию *in vitro* ионов меди и цинка в различных концентрациях.

**Защищаемые положения:**

1. ПХБ, присутствующие в корме и грунте, снижают активность гликозидаз и изменяют кинетические характеристики гидролиза углеводов в кишечнике сеголетков плотвы.
2. Кратковременное действие хлорофоса и MNNG в эмбриональный период, изменяет активность гликозидаз и кинетические характеристики гидролиза углеводов в кишечнике развивающихся сеголетков плотвы. Зависимость изученных показателей от концентрации токсиканта носит нелинейный характер.
3. Различные по природе органические ксенобиотики изменяют чувствительность пищеварительных гликозидаз молоди плотвы к раздельному и совместному действию ионов меди и цинка *in vitro*.

**Научная новизна.** Впервые показана высокая чувствительность пищеварительных гликозидаз молоди плотвы к действию органических ксенобиотиков *in vivo*. Хроническое действие ПХБ, присутствующих в корме и грунте, снижает уровень амилолитической активности и активности сахаразы, а также сродство ферментов к субстрату, замедляя скорость начальных этапов ассимиляции углеводов. Кратковременное действие малых концентраций хлорофоса и MNNG в эмбриональный период вызывает разнонаправленные изменения активности гликозидаз и кинетических характеристик гидролиза углеводов в кишечнике развивающейся молоди плотвы. При действии хлорофоса выявлена U-образная зависимость активности гликозидаз, указывающая на стимулирующий эффект в крайних точках исследованного диапазона концентраций токсиканта. Нелинейный характер концентрационной зависимости выявлен и при эмбриотоксическом действии MNNG. При этом концентрации, отличающиеся на 5–6 порядков, вызывают равные по силе и направленности эффекты. Установлены адаптивные изменения сродства ферментов к субстрату в ответ на эмбриотоксическое действие низких и сверхнизких концентраций хлорофоса и MNNG. Впервые показано, что органические ксенобиотики изменяют чувствительность гликозидаз молоди плотвы к раздельному и совместному действию меди и цинка *in vitro*. Величина и направленность эффектов зависят от природы и концентрации токсических агентов.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные данные расширяют представления о механизмах адаптаций пищеварительной функции рыб к действию антропогенных факторов. Результаты работы важны как для оценки характера влияния чужеродных веществ в эмбриональный период развития на гидролитическую функцию пищеварительной системы развивающихся рыб, так и для прогнозирования риска воздействия органических ксенобиотиков на скорость начальных этапов ассимиляции углеводных компонентов корма. Данные о модифицирующем влиянии органических ксенобиотиков на эффекты меди и цинка могут быть использованы при разработке новых подходов к определению антропогенных нагрузок на водные экосистемы. Кроме того, результаты работы необходимо учитывать при разработке рациональных условий разведения и питания рыб в условиях аквакультуры. Полученные данные могут быть использованы в курсах лекций по экологии, общей токсикологии, а также экологической биохимии и физиологии рыб.

**Апробация работы.** Результаты работы представлены на Межд. научно-практической конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов-2» (Борок, 2007); 2-ой научной конференции с участием стран СНГ «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск,

2007); XIII Школе-конференции молодых учёных «Биология внутренних вод» (Борок, 2007); Всерос. конференции с международным участием: «Механизмы функционирования висцеральных систем» (СПб, 2007); III Всерос. объединенной конференции по водной токсикологии: «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы» и конференции по гидроэкологии: «Критерии оценки качества вод и методы нормирования антропогенных нагрузок» (Борок, 2008); Всерос. конференции «Водные и наземные экосистемы: проблемы и перспективы исследований» (Вологда, 2008); III Межд. конференции «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск, 2010); XIV Школе-конференции молодых учёных «Биология внутренних вод» (Борок, 2010).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 9 статей (в том числе 3 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК РФ) и 4 тезисов.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста, состоит из введения, шести глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 252 источника, в том числе 135 на иностранном языке, и содержит 7 рисунков и 11 таблиц.

**Благодарность.** Выражаю глубокую благодарность д.б.н. И.Л. Головановой за руководство научной работой; к.б.н. М.Г. Таликиной, д.б.н. Г.М. Чуйко, к.б.н. Ю.Г. Изюмову, к.б.н. Ю.В. Чеботаревой – соавторам совместных публикаций, за помощь в постановке токсикологических экспериментов *in vivo* и ценные замечания при обсуждении результатов работы; д.б.н., проф. В.В. Кузьминой за внимание к работе и конструктивное обсуждение результатов.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Обзор литературы

В главе дана характеристика органических загрязнителей (ПХБ, хлорофос, MNNG) и тяжелых металлов (медь и цинк). Рассмотрены источники и пути их поступления, а также влияние на различные аспекты жизнедеятельности гидробионтов. Представлены сведения о роли углеводов в питании рыб и ферментах, обеспечивающих переваривание углеводных компонентов пищи. Рассмотрено влияние природных и антропогенных факторов на активность пищеварительных гликозидаз рыб.

### Глава 2. Материалы и методы исследования

Работа проведена в 2004–2010 гг. в лаборатории экологии рыб Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН.

Объект исследования – плотва обыкновенная *Rutilus rutilus* (L.) (сем. Cyprinidae, отр. Cypriniformes, кл. Osteichthyes, тип Vertebrata) широко распространена в пресных и солоноватых водоемах России и входит в состав промысловых уловов. По характеру питания – эврифаг. Молодь плотвы питается зоопланктоном, начиная со второго года жизни и во взрослом состоянии – разнообразными беспозвоночными и их личинками, водными растениями и мелкими моллюсками (Атлас ..., 2002). Поскольку плотва проявляет высокую чувствительность к действию физических и химических агентов в эмбриональный период развития, она часто используется в исследовательских целях (Таликина, 1996; Таликина и др., 1999, 2003, 2005; Изюмов и др., 2003, 2004; Чеботарева и др., 2009).

Взрослые особи (масса  $285 \pm 40$  г) и сеголетки плотвы (масса  $1.5 \pm 0.2$  г) отловлены неводом и ставными сетями в Волжском плесе Рыбинского водохранилища. Для опытов *in vitro* по влиянию меди и цинка использовали рыб, отловленных в летне-осенний период. Эксперименты *in vivo* проведены на молоди плотвы, полученной путем искусственного скрещивания производителей, выловленных весной. В дальнейшем ее подращивали в прудах с естественным кормом на экспериментально-прудовой базе ИБВВ РАН. Всего в работе исследовано 360 экз. плотвы.

**Таблица 1.** Количество рыб, использованных для решения различных задач.

Задача	Количество исследованных рыб, экз.
Влияние ПХБ, содержащихся в корме и грунте, на активность гликозидаз и кинетические характеристики гидролиза углеводов у сеголетков плотвы	42
Влияние хлорофоса в период эмбриогенеза на активность гликозидаз и кинетические характеристики гидролиза углеводов в кишечнике развивающихся сеголетков плотвы	122
Влияние MNNG в период эмбриогенеза на активность гликозидаз и кинетические характеристики гидролиза углеводов в кишечнике развивающихся сеголетков плотвы	160
Влияние ионов меди и цинка <i>in vitro</i> на активность гликозидаз кишечника плотвы различных возрастных групп:	
сеголетки	26
взрослые	10

В эксперименте с ПХБ сеголетков содержали в двух 200-л аквариумах (по 25 экз. в каждом) при температуре 12–18°C, pH 7.5–7.6, содержании кислорода 8.0–9.7 мг/л. В качестве источника ПХБ использовали корм (фарш из мышц леща) и грунт из наиболее загрязненного участка Рыбинского водохранилища – Шекнинского плеса (опытная группа) и более чистого Моложского плеса (контрольная группа). Содержание ПХБ в корме рыб

опытной и контрольной групп составило 50.8 и 3.7 нг/г сырой массы, в грунте – 425.6 и 24.8 нг/г сухой массы соответственно (Чуйко и др., 2010). Общее содержание ПХБ определено методом хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения в лаборатории аналитической экотоксикологии ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН. До начала опыта всех рыб в течение 30 сут адаптировали к лабораторным условиям и кормили 3 раза в неделю фаршем с более низким содержанием ПХБ в количестве 10 % массы рыбы. Рыб для анализа (по 6 экз. в каждой точке) отбирали в начале эксперимента и через 40, 96 и 218 сут.

Для изучения отдаленных последствий кратковременного влияния органических ксенобиотиков осемененную икру плотвы инкубировали в кристаллизаторах с растворами хлорофоса концентрацией  $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-2}$  мг/л или MNNG –  $3 \cdot 10^{-7}$ – $3 \cdot 10^{-1}$  мг/л, приготовленными на речной воде (рН 7.2–7.4). Инкубация продолжалась до стадии подвижного эмбриона, что при температуре 15–17°C составило 54 и 48 часов соответственно. Икра, инкубированная в кристаллизаторах с чистой речной водой, служила контролем. Приготовление растворов токсикантов и их смену, а также смену воды в контроле проводили дважды в сутки. Затем растворы были заменены речной водой. После утилизации желточного мешка и перехода на внешнее питание личинки развивались в однотипных выростных прудах с естественной кормовой базой. Выживаемость молоди в контроле и всех вариантах эмбриотоксического воздействия не превышала 77 % от общего числа посаженных личинок. Для анализа отбирали 4-х месячных сеголетков плотвы (по 20–22 экз. в каждой точке) и определяли у них длину и массу тела, а также абсолютную и относительную длину и массу кишечника.

Опыты по влиянию меди и цинка *in vitro* на активность гликозидаз проведены на взрослых особях и сеголетках плотвы из естественных популяций, а также молоди всех экспериментальных групп. В качестве источника металлов использовали сернокислые соли меди ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) и цинка ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Концентрации ионов меди и цинка, рассчитанные по общему содержанию металла в соли, составляли 0.1–25 мг/л, что соответствует содержанию этих металлов в естественной пище рыб (Соболев, 2006).

Активность гликозидаз определяли в суммарных гомогенатах слизистой оболочки кишечника от 6–22 экз. рыб при температуре 20°C и рН 7.4 в пяти повторностях. Амилитическую активность, отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал ( $\alpha$ -амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы КФ 3.2.1.20), а также активность сахаразы КФ 3.2.1.48 оценивали по приросту гексоз методом Нельсона (Nelson, 1944) в модификации Уголева и Иезуитовой (1969). Значения кажущейся константы Михаэлиса ( $K_m$ ) и максимальной скорости реакции ( $V$ ) определяли графическим способом Лайнуивера-Бэрк (Страйер, 1984).



Данные обработаны статистически с помощью пакета прикладных программ Statgraphics Plus 5.1 и Excel 2003. Результаты представлены в виде средних и их ошибок ( $M \pm m$ ). Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA, LSD-тест) при  $p = 0.05$  (Sokal, Rohlf, 1995).

### Глава 3. Влияние ПХБ, содержащихся в корме и грунте, на активность гликозидаз и кинетические характеристики гидролиза углеводов в кишечнике сеголетков плотвы

Большинство морфометрических показателей сеголетков плотвы, экспонированных в аквариумах с высоким и низким содержанием ПХБ, не различались. Лишь на 218 сут эксперимента длина и масса рыб опытной группы достоверно превышали контроль на 10 и 47 % соответственно (табл. 2).

**Таблица 2.** Морфометрические и физиолого-биохимические показатели сеголетков плотвы с низким и высоким содержанием ПХБ в корме и грунте.

Показатели	Продолжительность эксперимента, сут.			
	0	40	96	218
Масса тела, г	$2.69 \pm 0.34$ –	$3.65 \pm 0.62$ $2.96 \pm 0.22$	$3.62 \pm 0.43$ $3.18 \pm 0.45$	$3.64 \pm 0.34$ $5.35 \pm 0.60^*$
Длина тела, см	$6.15 \pm 0.15$ –	$6.53 \pm 0.27$ $6.18 \pm 0.10$	$6.42 \pm 0.17$ $6.25 \pm 0.17$	$6.67 \pm 0.12$ $7.32 \pm 0.25^*$
Амилолитическая активность, мкмоль/г-мин	$60.0 \pm 1.26$ –	$54.9 \pm 2.51$ $50.3 \pm 1.29$	$38.9 \pm 0.86$ $34.7 \pm 0.71^{**}$	$33.8 \pm 2.13$ $33.6 \pm 1.52$
$K_m$ гидролиза крахмала, г/л	$6.19 \pm 0.38$ –	$2.90 \pm 0.09$ $2.80 \pm 0.06$	$3.70 \pm 0.30$ $3.78 \pm 0.23$	$3.89 \pm 0.36$ $4.79 \pm 0.14^*$
$V$ гидролиза крахмала, мкмоль/г-мин	$72.5 \pm 1.05$ –	$52.9 \pm 1.33$ $52.6 \pm 1.14$	$49.1 \pm 2.34$ $39.6 \pm 1.79^*$	$44.3 \pm 2.36$ $41.8 \pm 0.84$
Активность сахаразы, мкмоль/г-мин	$4.51 \pm 0.04$ –	$1.90 \pm 0.06$ $1.66 \pm 0.07^*$	$1.87 \pm 0.04$ $1.26 \pm 0.05^{***}$	$1.65 \pm 0.07$ $2.18 \pm 0.09^{**}$
Число рыб, экз.	$\bar{6}$ –	$\bar{6}$ $\bar{6}$	$\bar{6}$ $\bar{6}$	$\bar{6}$ $\bar{6}$

Примечание. Приведены средние значения показателей и их ошибки ( $M \pm m$ ); над чертой – контроль, под чертой – опыт; \* – различия показателей статистически достоверны по сравнению с контролем при  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ .

Амилолитическая активность у рыб опытной группы достоверно снижалась на 11 % на 96 сут эксперимента и вновь достигала контрольных значений на 218 сут. Активность сахаразы изменялась разнонаправлено: снижалась на 13 и 33 % на 40-е и 96 сут и возрастала на 32 % на 218 сут опыта. Ранее аналогичные колебания активности  $\alpha$ -амилазы гепатопанкреаса и

кишечника были отмечены у карпа *Cyprinus carpio* (L.) при хроническом действии малых концентраций оловоорганических соединений (Бузинова, 1983). Кинетические характеристики гидролиза крахмала достоверно не изменялись. Исключение составили лишь  $V$  на 96 сут эксперимента, снизившаяся на 19 %, и  $K_m$  на 218 сут – ее значение увеличилось на 23 %, отражая снижение сродства ферментов к субстрату.

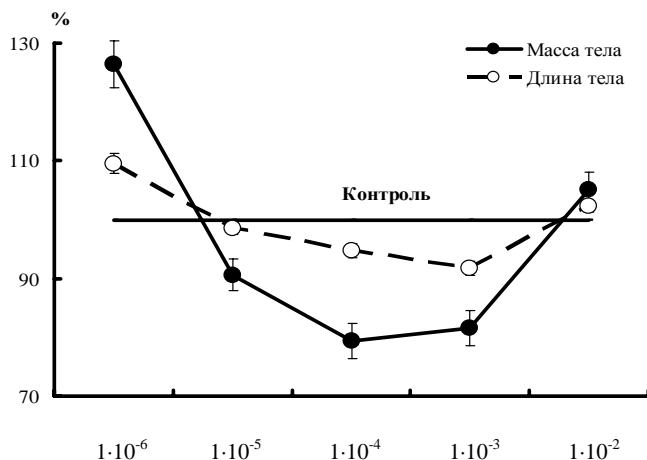
Снижение уровня активности гликозидаз в экспериментах *in vivo* может быть обусловлено как прямым негативным влиянием ПХБ на пищеварительные ферменты, так и опосредованным действием на интенсивность их синтеза. Увеличение морфометрических показателей и активности гликозидаз на 218-е сут опыта может быть связано с развитием компенсаторных реакций организма при длительном действии ПХБ в данных концентрациях.

Известно, что ПХБ изменяют активность ряда ферментов гепатопанкреаса и сыворотки крови рыб, а также вызывают увеличение относительной массы печени и содержания в ней гликогена (Ito et al., 1980; Melancon, Lech, 1983; Герман, Козловская, 2001; Chuiko et al., 2007). Данные по влиянию ПХБ на пищеварение у рыб в литературе отсутствуют. В рамках того же эксперимента установлено последовательное снижение протеолитической активности слизистой оболочки у сеголетков плотвы опытной группы на 10–26 % в течение всего периода наблюдений (Ушакова и др., 2008). Эти данные позволяют предположить большую чувствительность протеиназ плотвы к хроническому действию ПХБ по сравнению с гликозидазами. При этом в течение опыта протеолитическая активность у сеголетков контрольной группы увеличилась на 18 %, амилолитическая активность снизилась на 45 %, активность сахаразы уменьшилась на 63 % по сравнению с началом опыта (0 сут),  $p < 0.05$ . Эти результаты вполне закономерны и хорошо согласуются с представлениями о субстратном регулировании активности пищеварительных ферментов (Уголев, 1972), поскольку молодь рыб получала пищу с высоким содержанием белка.

Таким образом, хроническое 218 сут действие ПХБ, поступающих с загрязненной пищей и грунтом, не оказывает негативного влияния на морфометрические показатели подопытных сеголетков плотвы. На 96-е сут эксперимента установлено снижение активности гликозидаз слизистой оболочки кишечника на 11–33 %. Значение  $K_m$  гидролиза крахмала увеличивается на 23 % (218 сут), отражая снижение сродства ферментов к субстрату. Полученные данные свидетельствуют о снижении скорости начальных этапов ассимиляции углеводов в кишечнике плотвы при повышенном содержании ПХБ в корме и грунте.

**Глава 4. Влияние хлорофоса в период эмбриогенеза на активность гликозидаз и кинетические характеристики гидролиза углеводов в кишечнике развивающихся сеголетков плотвы**

Длина тела рыб контрольной группы составила  $6.8 \pm 0.1$  см, масса –  $6.0 \pm 0.3$  г.



**Рис. 1.** Длина и масса тела сеголетков плотвы опытной группы (воздействие хлорофоса в период эмбриогенеза) в % от контроля.

Хлорофос в ряду испытанных концентраций оказывает различное по силе и направленности действие на линейно-массовые характеристики сеголетков плотвы (рис. 1). Для большинства из них (длина и масса тела, абсолютная и относительная длина кишки) в крайних точках тестируемого диапазона концентраций характерен стимулирующий эффект, в промежуточных – угнетающий. Исключение составляют лишь абсолютная и относительная масса кишки, возросшие во всех вариантах опыта, особенно при действии самых низких концентраций хлорофоса.

Амилолитическая активность в слизистой оболочке кишечника рыб опытных групп достоверно снижается по сравнению с контрольными особями (табл. 3). Максимальное торможение на 45–49 % отмечено в вариантах с концентрацией хлорофоса  $1 \cdot 10^{-5}$  и  $1 \cdot 10^{-4}$  мг/л. Диаметральный эффект выявлен при анализе активности сахаразы, возросшей в 1.5–2 раза по сравнению с контролем. При этом наибольший стимулирующий эффект на 90–103 % отмечен в крайних точках испытанного ряда концентраций. У рыб опытной группы  $K_m$  гидролиза крахмала снижалась в 1.3–3.8 раза, величина эффекта отрицательно коррелировала с концентрацией токсиканта. Значения  $K_m$  гидролиза сахарозы, напротив,

возрастали в 2–4 раза обратно пропорционально концентрации хлорофоса. Изменения V менее значительны и совпадают с таковыми ферментативной активности.

**Таблица 3.** Физиолого-биохимические показатели сеголетков плотвы контрольной и опытной (воздействие хлорофосом в период эмбриогенеза) групп.

Показатели	Концентрация хлорофоса, мг/л					
	0	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$
Амилолитическая активность, мкмоль/г·мин	40.7±0.28 <sup>а</sup>	29.3±0.48 <sup>б</sup>	22.4±0.42 <sup>в</sup>	20.7±0.38 <sup>г</sup>	25.9±0.35 <sup>д</sup>	43.9±0.37 <sup>е</sup>
K <sub>m</sub> гидролиза крахмала, г/л	3.79±0.11 <sup>а</sup>	1.00±0.14 <sup>д</sup>	1.01±0.07 <sup>а</sup>	2.04±0.11 <sup>г</sup>	2.40±0.19 <sup>б</sup>	2.96±0.07 <sup>б</sup>
V гидролиза крахмала, мкмоль/г·мин	66.5±1.52 <sup>а</sup>	24.7±1.35 <sup>б</sup>	19.9±0.51 <sup>г</sup>	39.5±1.12 <sup>б</sup>	37.2±1.83 <sup>б</sup>	65.5±2.07 <sup>а</sup>
Активность сахаразы, мкмоль/г·мин	1.04±0.03 <sup>а</sup>	2.11±0.14 <sup>б</sup>	1.63±0.07 <sup>б</sup>	1.57±0.08 <sup>б</sup>	1.62±0.04 <sup>б</sup>	1.98±0.07 <sup>б</sup>
K <sub>m</sub> гидролиза сахаразы, ммоль	3.66±0.29 <sup>а</sup>	15.08±0.98 <sup>б</sup>	8.30±0.69 <sup>б</sup>	7.86±0.36 <sup>б</sup>	3.64±0.27 <sup>а</sup>	7.68±0.56 <sup>б</sup>
V гидролиза сахаразы, мкмоль/г·мин	1.20±0.03 <sup>а</sup>	2.99±0.14 <sup>д</sup>	2.13±0.06 <sup>б,г</sup>	2.00±0.11 <sup>б,в</sup>	1.75±0.04 <sup>б</sup>	2.30±0.09 <sup>г</sup>
Число рыб, экз.	20	20	20	20	20	22

Примечание: Приведены средние значения показателей и их ошибки ( $M \pm m$ ); надстрочные индексы указывают на статистически значимые отличия между показателями в строке,  $p < 0.05$ .

Закладка пищеварительной системы у рыб происходит в эмбриональный период, окончательное ее формирование завершается к концу личиночного периода развития. У большинства костистых рыб (в том числе и у карповых) амилолитическая активность в период эмбриогенеза чрезвычайно низка и увеличивается лишь после резорбции желточного мешка и перехода на экзогенное питание, что совпадает с началом функционирования поджелудочной железы (Остроумова, Дементьева, 1981). Разнонаправленные эффекты действия хлорофоса в период эмбриогенеза на амилолитическую активность и активность сахаразы у сеголетков плотвы могут быть связаны с неодинаковым влиянием токсиканта на процессы синтеза панкреатических ( $\alpha$ -амилаза) и собственно кишечных (мальтаза, сахараза) ферментов. Не исключено, что специфика задержанных ответов может быть обусловлена временными различиями становления функциональной активности указанных гликозидаз.

Значительное снижение амилолитической активности при эмбриотоксическом действии хлорофоса в концентрации  $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-3}$  мг/л отмечено у рыб с достоверно меньшими, по сравнению с контролем, размерно-весовыми показателями роста. Возможно, это связано со

снижением скорости утилизации углеводных компонентов корма. Изменения углеводного обмена у экспериментальной молоди при воздействии хлорофоса могут быть обусловлены также нарушением нормальной метаболической функции печени (Таликина и др., 2005). Вместе с тем, в варианте со сверхнизкой концентрацией токсиканта ( $1 \cdot 10^{-6}$  мг/л) снижение амилитической активности в кишечнике не отражается на длине и массе сеголетков, значения которых достоверно выше, чем у рыб в контроле.

В настоящее время принято считать, что токсические свойства хлорофоса обусловлены в основном образующимся из него более токсичным ДДВФ – диметил-дихлорвинилфосфатом. Поскольку уже через несколько часов после внесения хлорофоса в воду он практически весь переходит в ДДВФ (Nakahara et al., 1973), вполне вероятно, что и в наших экспериментах основной токсический эффект был обусловлен именно действием ДДВФ.

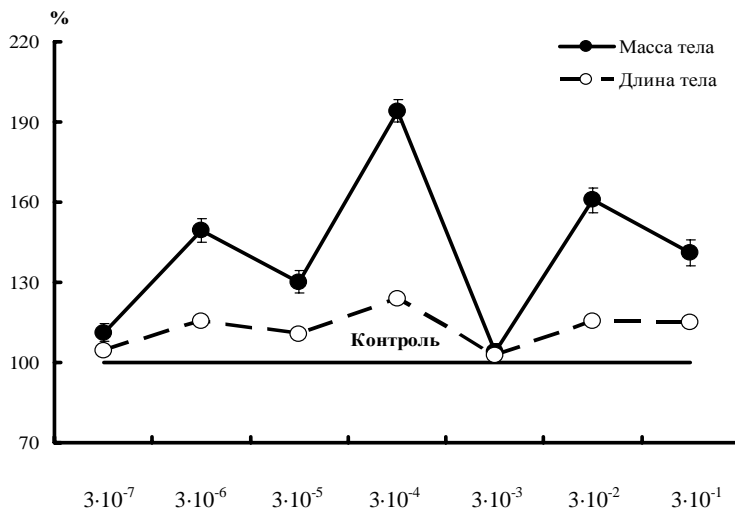
Таким образом, анализ отдаленных последствий кратковременного действия малых концентраций хлорофоса на ранних этапах эмбрионального развития выявил у развивающихся сеголетков плотвы неспецифические разнонаправленные изменения активности пищеварительных гликозидаз и кинетических характеристик гидролиза ди- и полисахаридов.

#### **Глава 5. Влияние MNNG в период эмбриогенеза на активность гликозидаз и кинетические характеристики гидролиза углеводов в кишечнике развивающихся сеголетков плотвы**

Длина тела рыб контрольной группы составила  $6.3 \pm 0.1$  см, масса –  $4.3 \pm 0.2$  г. При действии MNNG длина и масса тела подопытных сеголетков достоверно превышали аналогичные показатели контрольных рыб, за исключением варианта с концентрацией  $3 \cdot 10^{-3}$  мг/л (Рис. 2). Абсолютная масса кишечника подопытных рыб во всех вариантах токсического воздействия была на 20–80 % выше, чем у контрольных особей, другие морфометрические показатели (относительная масса, абсолютная и относительная длина кишечника) изменялись незначительно.

Вполне вероятно, что увеличение линейно-массового роста молоди плотвы после эмбриотоксического воздействия MNNG обусловлено компенсаторным увеличением эффективности усвоения белковых компонентов пищи, по сравнению с углеводными компонентами. Кроме того, низкая скорость начальных этапов ассимиляции углеводов может восполняться повышением эффективности заключительных этапов их усвоения, либо снижением энергетических расходов организма на двигательную активность, что нередко наблюдается при обилии корма в условиях токсического воздействия (Глубоков, 1990).

Уровень амилолитической активности и активности сахаразы в слизистой оболочке кишечника рыб опытных групп достоверно снижался по сравнению с контрольными особями (табл. 4).



**Рис. 2.** Длина и масса тела сеголетков плотвы опытной группы (воздействие MNNG в период эмбриогенеза) в % от контроля.

Крайние из испытанного диапазона концентрации ( $3 \cdot 10^{-7}$ ,  $3 \cdot 10^{-6}$  мг/л и  $3 \cdot 10^{-2}$ ,  $3 \cdot 10^{-1}$  мг/л) MNNG вызвали сходные эффекты: амилолитическая активность снижалась на 30–41 %, активность сахаразы на 38–46 % от контроля. Средние из испытанных концентраций MNNG, как правило, оказывали меньшие по величине тормозящие эффекты.

Сравнение кинетических характеристик гидролиза крахмала показало, что у подопытных сеголетков значения  $K_m$  снижаются в 1.6–2.5 раза по сравнению с контрольными особями, изменения  $V$  менее значительны. Исключение составляет опытный вариант с концентрацией MNNG  $3 \cdot 10^{-4}$  мг/л, в котором кинетические характеристики гидролиза крахмала достоверно не отличаются от аналогичных показателей у рыб контрольной группы. Максимальное снижение  $K_m$  гидролиза крахмала на 58–60 % отмечено в крайних точках ( $3 \cdot 10^{-7}$  и  $3 \cdot 10^{-1}$  мг/л) тестируемого диапазона концентраций MNNG.

Изменение  $K_m$  гидролиза сахаразы в зависимости от концентрации MNNG носит колебательный характер, при этом различные концентрации токсиканта оказывают как ингибирующий, так и стимулирующий эффект. Наибольшее снижение  $K_m$  гидролиза сахаразы

отмечено при концентрации MNNG  $3 \cdot 10^{-5}$  и  $3 \cdot 10^{-1}$  мг/л. Значения V гидролиза сахарозы у подопытных рыб снижаются в 1.3–1.6 раза, в большей степени при двух самых низких и самой высокой из испытанных концентраций.

**Таблица 4.** Физиолого-биохимические показатели сеголетков плотвы контрольной и опытных (воздействие MNNG в период эмбриогенеза) групп.

Показатели	Концентрация MNNG, мг/л							
	0	$3 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-1}$
Амилолитическая активность, мкмоль/г·мин	52.6±0.7 <sup>a</sup>	35.7±0.7 <sup>л</sup>	30.9±0.5 <sup>е</sup>	43.8±1.3 <sup>в</sup>	47.1±1.9 <sup>б</sup>	39.6±0.7 <sup>г</sup>	37.0±1.1 <sup>г,д</sup>	44.7±1.5 <sup>б</sup>
K <sub>m</sub> гидролиза крахмала, г/л	4.9±0.1 <sup>a</sup>	2.1±0.1 <sup>г</sup>	2.5±0.1 <sup>в</sup>	3.2±0.2 <sup>б</sup>	4.5±0.0 <sup>а</sup>	2.3±0.1 <sup>в,г</sup>	3.0±0.1 <sup>б</sup>	2.0±0.1 <sup>г</sup>
V гидролиза крахмала, мкмоль/г·мин	66.1±1.3 <sup>a</sup>	41.0±0.8 <sup>л</sup>	35.8±1.1 <sup>е</sup>	60.6±1.9 <sup>б</sup>	64.7±1.7 <sup>а</sup>	51.7±1.3 <sup>б</sup>	46.5±1.4 <sup>г</sup>	57.2±1.4 <sup>б</sup>
Активность сахаразы, мкмоль/г·мин	2.6±0.1 <sup>a</sup>	1.7±0.0 <sup>г,д</sup>	1.4±0.0 <sup>е</sup>	2.0±0.0 <sup>б</sup>	1.8±0.0 <sup>в,г</sup>	1.8±0.0 <sup>в</sup>	1.8±0.1 <sup>в,г</sup>	1.6±0.1 <sup>л</sup>
K <sub>m</sub> гидролиза сахарозы, ммоль	4.5±0.2 <sup>a</sup>	3.4±0.3 <sup>в</sup>	7.2±0.1 <sup>г</sup>	3.5±0.3 <sup>б,в</sup>	6.5±0.5 <sup>г</sup>	4.2±0.2 <sup>а,б</sup>	9.1±0.1 <sup>л</sup>	4.5±0.5 <sup>а</sup>
V гидролиза сахарозы, мкмоль/г·мин	2.9±0.1 <sup>a</sup>	1.9±0.1 <sup>г,д</sup>	1.8±0.0 <sup>л</sup>	2.2±0.1 <sup>б,в</sup>	2.2±0.1 <sup>б,в</sup>	2.0±0.0 <sup>в,г</sup>	2.3±0.1 <sup>б</sup>	1.8±0.1 <sup>л</sup>
Число рыб, экз.	20	20	20	20	20	20	20	20

Примечание. Приведены средние значения показателей и их ошибки ( $M \pm m$ ); разные надстрочные индексы указывают на статистически значимые отличия между показателями в строке,  $p < 0.05$ .

В настоящее время экспериментально показана высокая чувствительность плотвы в период эмбриогенеза к действию ряда физических (температура, электромагнитные волны) и химических (формалин, хлорофос, актиномицин, ПХБ, MNNG) агентов (Кузьмина, Таликина, 1998; Таликина и др., 1999, 2003, 2005; Изюмов и др., 2003, 2004; Чеботарева и др., 2009; Крылов и др., 2010). Результатом таких воздействий является снижение жизнеспособности и линейно-массового роста развивающегося потомства, нарушения функциональных характеристик репродуктивных желез, морфологические аномалии позвонков, а также другие онтогенетические нарушения с явной патологией. При этом значительные изменения многих морфофизиологических показателей отмечены не только при действии низких, но и сверхнизких концентраций биологически активных веществ.

Таким образом, при изучении отдаленных последствий кратковременного действия малых концентраций MNNG в период раннего эмбриогенеза выявлено неспецифическое снижение активности пищеварительных гликозидаз на фоне увеличения показателей линейно-массового роста 4-х месячной молоди плотвы. У рыб опытной группы выявлено адаптивное увеличение фермент-субстратного сродства в ответ на эмбриотоксическое действие MNNG.

## Глава 6. Влияние органических токсикантов на чувствительность гликозидаз сеголетков плотвы к действию ионов меди и цинка *in vitro*

Влияние ионов меди и цинка на амилолитическую активность у плотвы различных возрастных групп. Амилолитическая активность ( $58.1 \pm 1.47$  мкмоль/г·мин) в слизистой оболочке кишечника сеголетков плотвы из естественной популяции Рыбинского водохранилища более чем в 5 раз превышает активность ферментов у взрослых особей ( $9.84 \pm 0.19$  мкмоль/г·мин) (табл. 5).

**Таблица 5.** Снижение амилолитической активности (% контроля) в кишечнике плотвы в присутствии ионов меди и цинка *in vitro* ( $p < 0.05$ ).

Плотва	Снижение амилолитической активности (% контроля)				
	Концентрация ионов, мг/л				
	0.1	1	5	10	25
Медь					
Сеголетки	=	13	17	38	84
Взрослые*	=	10	18	30	37
Цинк					
Сеголетки	=	22	26	34	54
Взрослые*	9	12	19	21	29

Примечание. \* – использовали гомогенаты слизистой оболочки кишечника, приготовленные индивидуально от каждой особи, «=>» – близкий к контролю эффект.

Эти данные подтверждают сведения о большей активности гликозидаз в кишечнике молоди по сравнению с половозрелыми рыбами (Уголев, Кузьмина, 1993). В присутствии меди и цинка уровень ферментативной активности последовательно снижается с ростом концентрации металлов. В подавляющем большинстве случаев тормозящий эффект более выражен у сеголетков плотвы по сравнению с половозрелыми особями. Максимальное снижение амилолитической активности, отмеченное при концентрации ионов металлов 25 мг/л, у сеголетков примерно в 2 раза больше, чем у взрослых рыб. Различия в чувствительности гликозидаз кишечника плотвы к



действие меди и цинка могут быть обусловлены разной биологической ролью этих металлов в организме, а также различным их содержанием в пище и в тканях кишечника.

Влияние ПХБ на чувствительность гликозидаз к действию меди и цинка. В начале эксперимента (0 сут) амилалитическая активность в кишечнике сеголетков в присутствии ионов меди или цинка снижалась на 18–62 % от контроля при всех испытанных концентрациях металлов (табл. 6).

**Таблица 6.** Снижение амилалитической активности (% контроля) в кишечнике сеголетков плотвы, получавших корм с низким (над чертой) и высоким (под чертой) содержанием ПХБ в присутствии ионов меди и цинка *in vitro* ( $p < 0.05$ )

Время, сут.	Снижение амилалитической активности (% контроля)				
	Концентрация ионов, мг/л				
	0.1	1	5	10	25
<b>Медь</b>					
0	<u>18</u> –	<u>19</u> –	<u>23</u> –	<u>47</u> –	<u>62</u> –
40	<u>≡</u> =	<u>≡</u> 13	<u>≡</u> 33	<u>43</u> 49	<u>44</u> 57
96	<u>≡</u> =	<u>≡</u> 18	<u>25</u> 25	<u>39</u> 42	<u>53</u> 73
218	<u>≡</u> =	<u>≡</u> 19	<u>≡</u> 24	<u>30</u> 33	<u>46</u> 69
<b>Цинк</b>					
0	<u>18</u> –	<u>26</u> –	<u>28</u> –	<u>36</u> –	<u>41</u> –
40	<u>≡</u> =	<u>≡</u> 12	<u>≡</u> 25	<u>≡</u> 31	<u>≡</u> 38
96	<u>≡</u> =	<u>≡</u> 24	<u>25</u> 28	<u>35</u> 49	<u>49</u> 59
218	<u>≡</u> =	<u>21</u> =	<u>20</u> 25	<u>52</u> 48	<u>54</u> 54
<b>Медь и цинк</b>					
0	<u>32</u> –	<u>34</u> –	<u>45</u> –	<u>60</u> –	<u>77</u> –
40	<u>≡</u> 11	<u>≡</u> 22	<u>31</u> 44	<u>36</u> 55	<u>42</u> 60
96	<u>≡</u> =	<u>≡</u> 16	<u>51</u> 30	<u>55</u> 49	<u>62</u> 67
218	<u>≡</u> =	<u>≡</u> =	<u>43</u> 26	<u>48</u> 48	<u>56</u> 66

Примечание. «≡» – близкий к контролю эффект, «–» – отсутствие данных.

Совместное действие меди и цинка усиливало тормозящий эффект, а степень торможения возрастала по мере увеличения концентрации металла.

Через 40 сут эксперимента у сеголетков, получавших ПХБ с кормом и грунтом, амилитическая активность в присутствии ионов меди и цинка снижалась более значительно по сравнению с особями контрольной группы. При этом отмечено как усиление степени торможения при одной и той же концентрации металла, так и наличие тормозящего эффекта в более широком диапазоне концентраций у рыб опытной группы по сравнению с контрольной. Медь оказывает более выраженный эффект по сравнению с цинком, а их совместное действие усиливает величину раздельного влияния. На 96-е и 218-е сут эксперимента в большинстве случаев выявлены эффекты, аналогичные полученным на 40-е сут опыта, а степень максимального торможения, отмеченного при концентрации металлов 25 мг/л, на 6–16 % выше, чем на 40-е сут.

Влияние хлорофоса на чувствительность гликозидаз к действию меди и цинка. В ряду испытанных концентраций хлорофос оказывает различное действие на чувствительность гликозидаз к действию меди и цинка *in vitro* (табл. 7). Амилитическая активность в присутствии ионов меди в большинстве случаев снижается. При этом четкий концентрационно-зависимый эффект выявлен у рыб контрольной группы и в вариантах опыта с концентрацией хлорофоса  $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-3}$  мг/л. В присутствии цинка активность гликозидаз у рыб контрольной группы снижается при всех концентрациях металла, в вариантах с концентрацией хлорофоса  $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-2}$  мг/л – лишь при наиболее высоких концентрациях металла. У особей, подвергнутых действию низких доз хлорофоса ( $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-4}$  мг/л) в эмбриональный период, в ряде случаев отмечено увеличение ферментативной активности в присутствии низких концентраций ионов меди и цинка.

Влияние MNNG на чувствительность гликозидаз к действию меди и цинка. У сеголетков контрольной группы в присутствии ионов меди или цинка (1–25 мг/л) амилитическая активность снижается на 10–69 %. При совместном действии металлов ингибирующий эффект усиливается и носит четко выраженный концентрационно-зависимый характер. Действие MNNG в период эмбриогенеза в большинстве случаев снижает чувствительность гликозидаз к действию металлов (степень торможения, как правило, снижается). Лишь в варианте опыта с концентрацией MNNG  $3 \cdot 10^{-3}$  мг/л тормозящие эффекты меди и цинка усиливаются, особенно при их совместном действии.

Таким образом, токсические вещества органической природы (ПХБ, хлорофос и MNNG) не только изменяют активность пищеварительных гликозидаз, но и изменяют их чувствительность к действию биогенных металлов. Величина и направленность эффектов зависят от природы и концентрации токсических агентов. Повышенное содержание ПХБ в корме и грунте увеличивает чувствительность гликозидаз к действию исследованных металлов на 6–22 %.

**Таблица 7.** Изменения амилалитической активности (% контроля) в кишечнике сеголетков плотвы при эмбриотоксическом действии хлорофоса в присутствии ионов меди и цинка *in vitro* ( $p < 0.05$ ).

Концентрация хлорофоса, мг/л	Изменения амилалитической активности (% контроля)				
	Концентрация ионов, мг/л				
	0.1	1	5	10	25
<b>Медь</b>					
0.0	=	-8	-18	-29	-44
$1 \cdot 10^{-6}$	+41	+49	=	-31	-69
$1 \cdot 10^{-5}$	=	-14	-31	-49	-98
$1 \cdot 10^{-4}$	=	-10	-13	-15	-46
$1 \cdot 10^{-3}$	-8	-18	-32	-46	-90
$1 \cdot 10^{-2}$	=	=	-8	-9	-28
<b>Цинк</b>					
0.0	-9	-19	-22	-28	-47
$1 \cdot 10^{-6}$	+20	=	=	=	=
$1 \cdot 10^{-5}$	+17	+10	=	=	=
$1 \cdot 10^{-4}$	+10	+8	=	-17	-32
$1 \cdot 10^{-3}$	=	=	=	-20	-27
$1 \cdot 10^{-2}$	=	-8	-9	-10	-32

Примечание. эффекты: «+» – позитивный, «-» – негативный, «=» – близкий к контролю.

Эмбриотоксическое действие хлорофоса в большинстве случаев усиливает тормозящий эффект на 8–54 % и снижает таковой цинка на 8–47 %. MNNG, как правило, снижает чувствительность гликозидаз к действию меди и цинка на 10–40 %.

### Заключение

Экспериментально показана высокая чувствительность пищеварительных гликозидаз плотвы к действию органических ксенобиотиков (ПХБ, хлорофос, MNNG) не только в низких, но и в сверхнизких концентрациях. Сверхнизкими концентрациями биологически активных веществ считают значения  $10^{-12}$ – $10^{-15}$  моль, когда на 1 клетку приходится от 1 до 10 молекул вещества (Бурлакова, др., 1990; Гуревич, 2001). Выделяют несколько особенностей их действия: неустойчивость величины и знака эффекта, совпадение эффектов сверхмалых доз препаратов и доз, превышающих их на несколько порядков, а также наличие «мёртвой зоны», в которой эффект отсутствует (Бурлакова и др., 1990; Гуревич, 2001).

Анализ результатов эмбриотоксического действия малых концентраций хлорофоса и MNNG на молодь плотвы выявил сходную парадоксальную закономерность. Показано, что пищеварительные гликозидазы развивающихся сеголетков проявляют высокую чувствительность к эмбриотоксическому действию не только низких, но и сверхнизких (порядка  $2\text{--}4 \cdot 10^{-12}$  моль) концентраций органических токсикантов. При действии хлорофоса на осеменённую икру зависимость показателей активности пищеварительных гликозидаз и параметров линейно-массового роста сеголетков от концентрации раствора была U-образной, указывая на стимулирующий эффект крайних доз токсиканта. Нелинейный характер дозовой зависимости проявился и при анализе эмбриотоксического действия MNNG на показатели линейно-массового роста и активность гликозидаз кишечника плотвы. Необходимо отметить, что снижение скорости начальных этапов ассимиляции углеводов происходит на фоне увеличения линейно-массового роста. Анализ  $K_m$  гидролиза сахарозы выявил не только нелинейный, но и нестабильный характер его значений в диапазоне испытанного концентрационного ряда MNNG, в котором повышение сродства ферментов к субстрату чередуется со снижением. При этом эффекты сверхмалых концентраций и концентраций, отличающихся на 5–6 порядков соизмеримы.

В условиях хронического 218-сут эксперимента повышенное содержание ПХБ в корме и грунте не оказывает негативного влияния на морфометрические показатели подопытных сеголетков плотвы. В то же время на 96-е сут эксперимента установлено снижение активности гликозидаз, а на 218-е сут – снижение фермент-субстратного сродства, свидетельствующие о снижении скорости начальных этапов ассимиляции углеводов в кишечнике плотвы. Снижение активности протеиназ (Ушакова и др., 2008) у сеголетков опытной группы на протяжении всего периода наблюдений демонстрирует, что в условиях данного эксперимента ПХБ в большей степени снижают скорость начальных этапов ассимиляции белковых, чем углеводных компонентов корма.

Чувствительность гликозидаз плотвы к действию меди и цинка, в концентрациях, встречающихся в объектах питания рыб, снижается с возрастом. Различные по природе органические ксенобиотики изменяют чувствительность пищеварительных гликозидаз молоди плотвы к раздельному и совместному действию ионов меди и цинка. Повышенное содержание ПХБ в корме и грунте увеличивает чувствительность гликозидаз к действию исследованных металлов. Повышение чувствительности происходит как за счет увеличения степени тормозящего эффекта при одной и той же концентрации металла, так и снижения активности ферментов в более широком диапазоне концентраций металла. Эмбриотоксическое действие хлорофоса в большинстве случаев усиливает тормозящий эффект меди и снижает таковой цинка. Действие MNNG в эмбриональный период, как правило, снижает чувствительность

гликозидаз к действию меди и цинка. Величина и направленность эффектов зависят от природы и концентрации токсических агентов.

Полученные данные свидетельствуют о разнонаправленном влиянии органических загрязнителей на гидролиз углеводов у молоди плотвы. Снижение активности гликозидаз и повышение их чувствительности к негативному действию тяжелых металлов при действии органических ксенобиотиков замедляет скорость начальных этапов ассимиляции углеводов у рыб, обитающих в районах с повышенной антропогенной нагрузкой. Результаты работы важны для оценки характера влияния чужеродных токсических соединений на гидролитическую функцию пищеварительной системы развивающихся рыб, а также для прогнозирования риска действия органических токсикантов в условиях антропогенного загрязнения водоемов.

### ВЫВОДЫ

1. Хроническое (218 сут) действие ПХБ, поступающих с пищей и грунтом, оказывает негативное влияние на гидролиз углеводов в кишечнике сеголетков плотвы. Активность гликозидаз слизистой оболочки снижается на 11–33 % (96 сут), значения  $K_m$  гидролиза крахмала увеличиваются на 23 % (218 сут), отражая снижение сродства ферментов к субстрату.
2. Кратковременное действие низких концентраций хлорофоса в период раннего эмбриогенеза вызывает разнонаправленные изменения кинетических характеристик и активности гликозидаз у сеголетков плотвы. Активность сахаразы возрастает на 51–103%, амилитическая активность, как правило, снижается на 28–49%. Значения  $K_m$  гидролиза сахарозы увеличиваются в 2–4 раза,  $K_m$  гидролиза крахмала снижаются в 1.3–3.8 раза, при этом сверхнизкие концентрации хлорофоса вызывают большие изменения. Зависимость активности пищеварительных гликозидаз от концентрации токсиканта носит U-образный характер, указывая на стимулирующий эффект в крайних точках.
3. Кратковременное действие низких концентраций MNNG в период раннего эмбриогенеза плотвы вызывает снижение активности гликозидаз слизистой оболочки кишечника на 10–46 %. Значения  $K_m$  гидролиза крахмала снижаются в 1.6–2.5 раза,  $K_m$  гидролиза сахарозы изменяются разнонаправлено. Зависимость изученных показателей от концентрации токсиканта носит нелинейный характер, а концентрации MNNG, отличающиеся на 5-6 порядков, могут вызывать равные эффекты.
4. Снижение значений  $K_m$  гидролиза углеводов, свидетельствующее об увеличении фермент-субстратного сродства, можно отнести к адаптивным реакциям в период раннего онтогенеза

плотвы в ответ на эмбриотоксическое действие низких и сверхнизких концентраций хлорофоса и MNNG.

5. Различные по природе органические ксенобиотики изменяют чувствительность пищеварительных гликозидаз молоди плотвы к раздельному и совместному действию ионов меди и цинка *in vitro*. Повышенное содержание ПХБ в корме и грунте увеличивает чувствительность гликозидаз к действию исследованных металлов. Эмбриотоксическое действие хлорофоса в большинстве случаев усиливает тормозящий эффект меди и снижает таковой цинка. MNNG, как правило, снижает чувствительность гликозидаз к действию меди и цинка.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

#### Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Голованова И.Л., Таликина М.Г., Филиппов А.А., Изюмов Ю.Г., Чеботарева Ю. В. Влияние сверхмалых концентраций N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина на ранний онтогенез плотвы *Rutilus rutilus*: Активность карбогидраз и кинетические характеристики гидролиза углеводов в кишечнике сеголетков // Вопросы ихтиологии. 2008. Т. 48. № 2. С. 276–283.
2. Филиппов А.А., Голованова И.Л. Раздельное и совместное влияние меди и цинка *in vitro* на скорость гидролиза углеводов у пресноводных костистых рыб // Биология внутренних вод. 2010. № 1. С. 104–109.
3. Голованова И.Л., Кузьмина В.В., Чуйко Г.М., Ушакова Н.В., Филиппов А.А. Влияние полихлорированных бифенилов на активность протеиназ и карбогидраз в кишечнике молоди плотвы *Rutilus rutilus* (L.) // Биология внутренних вод. 2011. № 2. С. 97–103.

#### Статьи в других изданиях:

4. Филиппов А.А. Влияние различных концентраций ионов меди и цинка на активность сахаразы в слизистой оболочке кишечника плотвы в различные сезоны года // Матер. регион. науч. студ. конф.: «Современные проблемы биологии, экологии, химии». Ярославль. 2006. С. 162–167.
5. Голованова И.Л., Таликина М.Г., Филиппов А.А. Влияние сверхнизких концентраций нитрозогуанидина в период эмбриогенеза на чувствительность пищеварительных карбогидраз сеголетков плотвы к действию биогенных металлов (Cu и Zn) // Матер. межд. конф. «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов – 2». Борок. 2007. С. 332–337.
6. Голованова И.Л., Таликина М.Г., Филиппов А.А. Отдаленные последствия влияния сверхнизких концентраций хлорофоса и нитрозогуанидина в период эмбриогенеза на физиолого-биохимические показатели сеголетков плотвы // Тез. науч. конф. с участием стран СНГ:

«Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов». Петрозаводск. 2007. С. 42–43.

7. Голованова И.Л., Таликина М.Г., Филиппов А.А. Влияние сверхнизких концентраций нитрозогуанидина в период эмбриогенеза на скорость ассимиляции углеводов в кишечнике плотвы // Тез. всерос. конф. с межд. участием: «Механизмы функционирования висцеральных систем». СПб. 2007. С. 86–87.

8. Голованова И.Л., Филиппов А.А. Влияние органических токсикантов на чувствительность пищеварительных карбогидраз плотвы к действию меди и цинка // Матер. межд. конф.: «Биология: теория, практика, эксперимент». Саранск. 2008. С. 21–25.

9. Голованова И.Л., Чуйко Г.М., Филиппов А.А. Влияние ПХБ на гидролиз углеводов у молоди плотвы // Матер. объедин. III всерос. конф. по водной токсикологии: «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы» и конф. по гидроэкологии: «Критерии оценки качества вод и методы нормирования антропогенных нагрузок». Борок. 2008. Ч. 2. С. 19–22.

10. Голованова И.Л., Филиппов А.А. Влияние ПХБ на устойчивость карбогидраз плотвы к действию Cu и Zn // Матер. всерос. конф.: «Водные и наземные экосистемы: проблемы и перспективы исследований». Вологда. 2008. С. 28–32.

11. Голованова И.Л., Филиппов А.А. Влияние антропогенных факторов на чувствительность карбогидраз рыб к действию тяжелых металлов // Тез. III межд. конф.: «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов». Петрозаводск. 2010. С. 36–38.

12. Филиппов А.А. Влияние органических загрязнителей на гидролиз углеводов у молоди плотвы // Тез. XIV школы-конференции молодых учёных «Биология внутренних вод». Борок. 2010. С. 59.

13. Филиппов А.А. Влияние органических загрязнителей на гидролиз углеводов у молоди плотвы // Матер. XIV школы-конференции молодых учёных «Биология внутренних вод». Борок. 2010. С. 150–157.