

ФИЗИОЛОГИЯ
ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 597.554.3:591.132.05:547.56

ВЛИЯНИЕ АМОРФНОГО ФЕНОЛА И ЕГО ФРАКЦИЙ
НА АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДАЗ КИШЕЧНИКА РЫБ

© 2021 г. В. В. Кузьмина*, А. Ф. Тарлева*. @

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
ул. Папанина, 109, пос. Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл., 152742 Россия
@E-mail: kobka_85@mail.ru

Поступила в редакцию 22.05.2020 г.

После доработки 15.06.2020 г.

Принята к публикации 15.06.2020 г.

При исследовании семи видов пресноводных костистых рыб (каarp *Cyprinus carpio* L., лещ *Abramis brama* (L.), густера *Blicca bjoerkna* (L.), плотва *Rutilus rutilus* (L.), речной окунь *Perca fluviatilis* L. и судак *Zander lucioperca* (L.)) показано, что в условиях *in vitro* эффекты аморфного фенола, а также его жидких фракций, образующихся через 12 мес. после производства, видоспецифичны и зависят от концентрации фенола и локализации пептидаз (слизистая оболочка или полость кишечника в случае химуса). Характер влияния аморфного фенола на активность пептидаз кишечника рыб значительно отличается от влияния кристаллического фенола.

DOI: 10.31857/S0002332921020077

Известно, что фенол относится к числу наиболее опасных для гидробионтов соединений, поступающих в поверхностные воды со стоками предприятий целлюлозно-бумажной, деревообрабатывающей, минеральной, химической, нефтяной и металлургической промышленности (Лукьяненко, 1967, 1983; Флеров, 1989; Clayton, Clayton, 1994; Michałowicz, Duda, 2007). Также источником фенола может быть затопленная при строительстве гидроэлектростанций древесина (Сурсыкова и др., 2011). Наличие в воде фенола в концентрациях, превышающих предельно допустимые (0.001 мг/л), негативно влияет на различные системы организма рыб: нервную, эндокринную, иммунную, репродуктивную и пищеварительную (Флеров, 1965, 1989; Waluga, 1966; Лукьяненко, 1967, 1983; Clayton, Clayton, 1994; Микряков и др., 2001; Ford *et al.*, 2001; Zaki *et al.*, 2011; Тарлева и др., 2018). Потребность в феноле значительна, поскольку он используется для получения бисфенола А (исходного вещества в производстве поликарбонатов), фенолоформальдегидных смол, синтеза ряда пестицидов и пластификаторов, капролактама, адипиновой кислоты, анилина, алкилфенолов, гидрохинона и других соединений. В последние годы фирмы вместо кристаллического фенола (КФ) поставляют аморфный фенол (АФ). Этот фенол имеет ту же формулу (C₆H₅OH), однако он значительно отличается от стандартного КФ как внешне (сплошная масса или рыхлые “глыбки” желтоватого цвета), так и способностью переходить в жидкое состояние через 12 мес. хранения при

комнатной температуре. КФ в течение многих лет сохраняет свою структуру, а температура его плавления 40.9°C (Гороновский и др., 1987). Если КФ у представителей семейств карповых Cyprinidae и шуковых Esocidae, а в ряде случаев и окуневых Percidae подавлял активность пептидаз, функционирующих в составе слизистой оболочки кишечника рыб (Кузьмина и др., 2017; Тарлева и др., 2018), то АФ в предварительных опытах у этих же видов часто вызывал стимуляцию активности пептидаз, что обусловило необходимость детальной оценки его влияния на активность этой группы ферментов.

Цель работы — изучение влияния АФ и его жидких фракций на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника у семи массовых видов рыб России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были исследованы лещ *Abramis brama* (L.) массой 650–750 г, густера *Blicca bjoerkna* (L.) массой 270–320 г, плотва *Rutilus rutilus* (L.) массой 300–380 г, речной окунь *Perca fluviatilis* L. массой 270–335 г и судак *Zander lucioperca* (L.) массой 480–560 г из Волжского плеса Рыбинского водохранилища, а также карп *Cyprinus carpio* L. массой 8–10 г и карась *Carassius auratus* (L.) массой 9–11 г, выращенные на прудовой базе ИБВВ РАН “Сунога”. Материал был собран в апреле–июне 2019 г. Использовали химус и гомогенаты слизистой оболочки кишечника в разведении 1 : 99 (раствор Рингера, pH 7.4).

Для оценки влияния АФ (Вектон, Россия) на активность пептидаз вначале предынкубировали 0.25 мл гомогената и 0.25 мл АФ в концентрациях 0.03–0.5 ммоль/л. Через 1 ч после начала предынкубации в пробирки добавляли 0.5 мл субстрата, и смесь инкубировали еще 30 мин. Все операции проводили при 20°C и непрерывном перемешивании. Активность пептидаз (преимущественно активность трипсина, КФ 3.4.21.4) оценивали по увеличению концентрации тирозина при 20°C (Kuz'mina *et al.*, 2019). О ферментативной активности судили по приросту продуктов реакции за 1 мин инкубации субстрата и ферментативно активного препарата с учетом фона (количество тирозина в исходном гомогенате) в расчете на 1 г сырой массы ткани, мкмоль/(г · мин). Интенсивность окрашивания определяли на фотоколориметре (КФК-2) при красном светофильтре, $\lambda = 670$ нм. Результаты были обработаны статистически с помощью стандартного пакета программ (Microsoft Office 95, приложение Excel). Степень различия между средними арифметическими и ошибкой среднего ($M \pm m$) оценивали с помощью критерия Стьюдента для малых выборок при $p < 0.05$, < 0.01 и < 0.001 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние АФ на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб разных видов. Степень влияния АФ на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб разных видов различна (табл. 1). АФ во всех исследованных концентрациях значительно ингибирует активность пептидаз лишь у плотвы. На ферменты карася, густеры, карпа, окуня и судака АФ оказывает стимулирующее влияние, наиболее значительное у судака, а при максимальной концентрации АФ – у первых двух видов. При исследовании леща выявлена смена влияния: при меньших концентрациях АФ (0.03–0.13 ммоль/л) наблюдается ингибирование, при максимальной концентрации – ярко выраженная стимуляция. В случае химуса, как правило, характер влияния АФ на активность пептидаз у бентофагов (карася, леща, плотвы, густеры, карпа) сохраняется, однако у густеры наблюдается смена влияния АФ. Особо следует отметить значительное стимулирующее влияние при всех концентрациях АФ на пептидазы химуса у ихтиофага – факультативного бентофага окуня, а также ингибирующее – у типичного ихтиофага судака.

Влияние различных фракций АФ на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса у бентофага карпа и ихтиофага судака. При переходе в жидкое состояние АФ образуются две четко различимые фракции: небольшая верхняя и в 4–5 раз бóльшая по объему нижняя фракция. Влияние этих фракций АФ на активность пептидаз

слизистой оболочки кишечника и химуса изучали на примере типичного бентофага карпа и типичного ихтиофага судака (табл. 2). Опытты показали, что верхняя фракция АФ одинаково влияет на пептидазы слизистой оболочки кишечника и химуса у карпа: при низких концентрациях наблюдается ингибирующее влияние, при более высоких – стимулирующее, особенно в случае химуса. У судака ингибирующее влияние АФ (0.03–0.25 ммоль/л) в большей мере проявляется в слизистой оболочке по сравнению с химусом, при концентрации АФ 0.5 ммоль/л сменяется стимуляцией. Нижняя фракция АФ у обоих видов рыб в большинстве случаев оказывает ингибирующее действие на активность пептидаз, особенно при низких концентрациях токсиканта.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При обсуждении результатов, касающихся влияния АФ и его растворимых фракций на активность пептидаз, важно подчеркнуть, что концентрация фенола 0.5 ммоль/л или 47.1 мг/л сопоставима с концентрациями, отмечающимися при антропогенном загрязнении водоемов (Michałowicz, Duda, 2007). Кроме того, в гастроэнтерологии модификаторные эффекты, не превышающие 15%, не рассматриваются как значимые. Следовательно, изменение ферментативной активности, не достигающее 15%, несмотря на достоверность различий, не может считаться значимым. Данные, касающиеся эффектов АФ, в ряде случаев существенно отличаются от результатов изучения влияния КФ на активность пептидаз у тех же видов рыб. Как отмечено выше, наличие КФ в тех же концентрациях, снижало активность пептидаз кишечника у представителей сем. карповых Cyprinidae и щуковых Esocidae. При этом пептидазы представителей сем. окуневых Percidae были относительно устойчивыми к действию фенола (Кузьмина и др., 2017; Тарлева и др., 2018). Действительно, лишь у плотвы все концентрации АФ вызывают значительное торможение пептидаз слизистой оболочки кишечника. У леща значимое торможение пептидаз слизистой оболочки и химуса вызывают только низкие концентрации (0.03–0.13 ммоль/л), а стимуляцию лишь концентрация 0.5 ммоль/л. У карася и карпа выявлена стимуляция пептидаз химуса при максимальной концентрации АФ, а у окуня в отличие от ранее полученных данных – при всех концентрациях АФ.

Приведенные выше данные не позволяют охарактеризовать механизмы влияния фенола на активность пептидаз, однако можно предположить, что в основе наблюдаемых эффектов лежит аллостерическая регуляция активности пептидаз. Аллостерическое регулирование может наблюдаться в тех случаях, когда субстрат-регулятор (модификатор), не будучи стерическим аналогом субстрата дан-

Таблица 1. Влияние аморфного фенола (АФ) на активность пептидаз химуса и слизистой оболочки кишечника рыб

Концентрация АФ, ммоль/л	Активность пептидаз кишечника рыб, мкмоль/(г · мин)						
	каarp	карась	плотва	густера	лещ	окунь	судак
0	4.76 ± 0.17 100	4.63 ± 0.05 100	2.10 ± 0.23 100	3.46 ± 0.15 100	5.14 ± 0.14 100	2.51 ± 0.06 100	1.13 ± 0.05 100
0.03	4.22 ± 0.09^a -12.4	4.88 ± 0.09^b +5.4	0.92 ± 0.13^b -56.3	3.54 ± 0.17 +2.5	3.13 ± 0.06^a -39.1	2.59 ± 0.12 +3.3	1.25 ± 0.06 +11.1
0.06	4.05 ± 0.24^a -14.9	4.93 ± 0.06^b +6.3	0.92 ± 0.05^b -56.3	3.50 ± 0.16 +1.3	3.97 ± 0.20 -22.8	2.80 ± 0.12^b +11.7	1.17 ± 0.00 +3.7
0.13	4.88 ± 0.21 +2.6	4.84 ± 0.14^b +4.5	0.96 ± 0.06^b -54.2	3.72 ± 0.13 +7.6	$4.09 \pm 0.0, 28$ -20.3	2.63 ± 0.09 +5.0	1.34 ± 0.06 +18.5
0.25	4.97 ± 0.20 +4.4	5.22 ± 0.05^a +12.6	1.18 ± 0.10^a -43.8	3.63 ± 0.13 +5.1	5.59 ± 0.28 +8.9	2.38 ± 0.09^a -5.0	1.42 ± 0.06^b +25.9
0.5	5.39 ± 0.09^b +13.6	6.01 ± 0.08^b +29.7	1.14 ± 0.19^a -45.8	4.42 ± 0.21^a +27.9	8.60 ± 0.28^b +67.5	2.67 ± 0.18 +6.7	1.75 ± 0.06^b +55.6
Химус							
0	4.30 ± 0.17 100	3.97 ± 0.05 100	10.50 ± 0.16 100	13.96 ± 0.10 100	2.21 ± 0.09 100	4.72 ± 0.09 100	8.06 ± 0.12 100
0.03	3.88 ± 0.12^a -9.7	4.01 ± 0.14 +1.1	11.16 ± 0.17^a +6.3	12.51 ± 0.16^b -10.3	1.42 ± 0.07^b -35.9	5.80 ± 0.12^b +23.0	6.55 ± 0.12^b -18.7
0.06	4.13 ± 0.09 -3.9	4.22 ± 0.09^b +6.3	8.66 ± 0.17^b -17.5	12.60 ± 0.16^b -9.7	1.46 ± 0.07^b -34.0	6.68 ± 0.08^b +41.6	6.85 ± 0.08^b -15.0
0.13	4.88 ± 0.16^a +13.6	4.26 ± 0.06^b +7.4	9.71 ± 0.06 -7.5	12.12 ± 0.10^b -13.2	1.73 ± 0.06^b -21.7	6.89 ± 0.14^b +46.0	6.30 ± 0.09^b -21.8
0.25	5.47 ± 0.23^b +27.2	4.34 ± 0.24 +9.5	9.76 ± 0.25^b -7.1	12.25 ± 0.25^b -12.2	2.05 ± 0.09^a -7.6	6.64 ± 0.14^b +40.7	6.47 ± 0.05^b -19.7
0.5	5.51 ± 0.24^b +28.2	5.14 ± 0.12^b +29.5	11.90 ± 0.16^a +13.3	11.42 ± 0.13^b -18.2	2.30 ± 0.09^b +3.8	6.97 ± 0.09^b +47.8	6.26 ± 0.20^b -22.3

Примечание. Над чертой – ферментативная активность. а – различия между опытом и контролем достоверны при $p < 0.05$, б – при $p < 0.01$, в – при $p < 0.001$. Под чертой – изменение активности пептидаз, % контроля, принятого за 100%; для табл. 1 и 2.

ного фермента, может связываться с ним в центре, пространственно не совпадающем с активным центром, вызывая изменение конфигурации и, как следствие, его активности (Jacob, Monod, 1961; Monod *et al.*, 1965). При этом известно, что такие мембранные ферменты, как аминокатаза, являются амфипатическими, причем гидрофильная часть молекулы выполняет каталитические функции, гидрофобная – якорные (Louvard *et al.*, 1975). Последняя также участвует в поддержании оптимальной конформации фермента и регуляции свойств гидрофильной части фермента (Уголев, 1972; Membrane ..., 1989).

Кроме того, важно отметить, что наименьшие из исследованных нами концентраций АФ и образующихся из него жидких фракций (0.03 и 0.06 ммоль/л

или 2.9 и 5.9 мг/л соответственно) значительно ниже концентрации КФ (12.5 мг/л), вызывающей резкое торможение условнорефлекторной деятельности у гуппи *Lebistes reticulatus* в условиях хронического эксперимента (Матей, 1970). Также известно, что КФ в сублетальной концентрации (3 мкг/л) вызывает патологические изменения структуры и ультраструктуры мезонефроса у серебряного карася *Carassius auratus* (Флерова (Назарова), Заботкина, 2012). Не исключено, что в условиях *in vivo* АФ и его жидкие фракции могут оказывать не только прямое, но и опосредованное влияние на синтез и активность пептидаз, поскольку фенол и его производные действуют не только на пищеварительную, но и на другие системы организма, а также на метаболизм рыб (Тарлева и др., 2018).

Таблица 2. Влияние различных фракций аморфного фенола (АФ) на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника (1) и химуса (2) рыб

Фракция АФ	Активность пептидаз кишечника рыб, мкмоль/(г · мин)					
	0*	0.03	0.06	0.13	0.25	0.5
Карп						
Верхняя (1)	4.84 ± 0.10 100	4.76 ± 0.11 -1.7	4.72 ± 0.12 +2.3	5.76 ± 0.28 +19.0	5.59 ± 0.18^b +15.5	6.1 ± 0.18^b +24.1
Нижняя (1)	6.52 ± 0.17 100	4.77 ± 0.10^b -26.9	5.51 ± 0.06^b -15.4	5.43 ± 0.23^b -16.8	6.04 ± 0.18 -7.4	7.39 ± 0.24^b +13.4
Верхняя (2)	1.02 ± 0.10 100	0.88 ± 0.09 -14.3	1.46 ± 0.14^a +42.9	1.75 ± 0.12^b +71.4	1.88 ± 0.21^a +83.7	1.92 ± 0.12^b +87.8
Нижняя (2)	2.00 ± 0.08 100	1.50 ± 0.08^b -25.0	1.21 ± 0.12^b -39.6	1.34 ± 0.16^a -33.3	1.42 ± 0.21^b -29.2	1.38 ± 0.09^b -31.3
Судак						
Верхняя (1)	3.15 ± 0.13 100	2.45 ± 0.06^b -22.2	2.32 ± 0.15^b -26.4	2.01 ± 0.17^b -36.1	2.54 ± 0.19^a -19.4	5.34 ± 0.06^b +69.4
Нижняя (1)	1.88 ± 0.22 100	1.40 ± 0.25 -25.6	1.09 ± 0.05^a -14.0	2.14 ± 0.15 +14.0	2.45 ± 0.20 +30.2	2.93 ± 0.32^b +55.8
Верхняя (2)	12.51 ± 0.12 100	10.19 ± 0.22^b -18.5	10.76 ± 0.27^b -14.0	11.73 ± 0.16^b -6.3	11.77 ± 0.21^a -5.9	15.31 ± 0.97^b +22.4
Нижняя (2)	12.51 ± 0.10 100	10.46 ± 0.21^b -16.4	10.19 ± 0.22^b -14.3	11.46 ± 0.65 -8.4	11.81 ± 0.19^a -5.8	13.84 ± 0.26^b +10.5

Примечание. * – концентрации АФ, ммоль/л.

Таким образом, степень воздействия АФ в условиях *in vitro* зависит от вида рыб, а также от локализации фермента (слизистая оболочка или полость кишечника в случае химуса). АФ в концентрациях 0.03–0.5 ммоль/л значительно снижает активность пептидаз слизистой оболочки кишечника у плотвы. У леща торможение активности пептидаз слизистой оболочки и химуса вызывают только низкие концентрации АФ (0.03–0.13 ммоль/л). У карася и густеры выявлена стимуляция активности пептидаз слизистой и химуса при максимальной концентрации АФ, у окуня при всех концентрациях АФ лишь в случае химуса. При исследовании судака отмечена стимуляция активности пептидаз слизистой при концентрациях 0.13–0.5 ммоль/л и торможение активности пептидаз химуса во всем диапазоне исследованных концентраций АФ. Предполагается, что в условиях *in vivo* АФ и образующиеся при его переходе в жидкое состояние фракции помимо прямого влияния могут оказывать опосредованное действие на активность пептидаз кишечника рыб.

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема № АААА-А18-118012690102-9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гороновский И.Т., Назаренко Ю.П., Некряч Е.Ф. Краткий справочник по химии. Киев: Наук. думка, 1987. 829 с.
- Кузьмина В.В., Тарлева А.Ф., Грачева Е.Л. Влияние различных концентраций фенола и его производных на активность пептидаз кишечника рыб // Биология внутр. вод. 2017. № 2. С. 104–111.
- Лукияненко В.И. Токсикология рыб. М.: Пищ. пром-сть, 1967. 320 с.
- Лукияненко В.И. Общая ихтиотоксикология. М.: Легкая и пищ. пром-сть, 1983. 320 с.
- Матей В.Е. Влияние субтоксических концентраций фенола на условнорефлекторную деятельность гуппи // Гидробиол. журн. 1970. Т. 6. № 3. С. 100–103.
- Микряков В.Р., Балабанова П.В., Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Попов А.В., Силкина Н.И. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.: Наука, 2001. 126 с.
- Сурсякова В.В., Бондарева Л.Г., Бурмакина Г.В., Рубайло А.И. Новые подходы к выявлению источников поступления фенолов в поверхностные водоемы // Доклады РАН. 2011. Т. 441. № 6. С. 767–770.
- Тарлева А.Ф., Шептицкий В.А., Кузьмина В.В. Реакция различных систем организма рыб на фенол и его производные (обзор) // Проблемы биологии про-

- дукт. животных. 2018. № 4. С. 27–44.
<https://doi.org/10.25687/1996-6733.prodanimbioi.2018.3.27-44>
- Уголев А.М. Мембранное пищеварение. Полисубстратные процессы, организация и регуляция. Л.: Наука, 1972. 358 с.
- Флеров Б.А. Влияние малых концентраций фенола на двигательную, пищевую активность и прирост живого веса карасей // Вопр. ихтиологии. 1965. Т. 5. № 1(34). С. 164–167.
- Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. Л.: Наука, 1989. 144 с.
- Флерова (Назарова) Е.А., Заботкина Е.А. Токсическое действие сублетальных концентраций фенола и нафталина на мезонефрос серебряного карася // Токсикол. вестн. 2012. № 4. С. 49–51.
- Clayton G.D., Clayton F.E. Patty's industrial hygiene and Toxicology. N.Y.: John Wiley & Sons inc., 1994. 132 p.
- Ford M.D., Delaney K.A., Ling L.J., Erickson T. Clinical Toxicology. Philadelphia: W.B. Saunders Comp., 2001. 753 p.
- Jacob F., Monod J. On the regulation of gene activity // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1961. V. 26. P. 193–211.
- Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Shalygin M.V. Role of peptidases of the enteric microbiota and prey in temperature adaptations of the digestive system in boreal carnivorous fish // Inland Water Biol. 2019. V. 12. № 2. P. 231–239.
- Louvard D., Maroux S., Vannier C., Desnuelle P. Topological studies on the hydrolases bound to the intestinal brush membrane. 1. Solubilization by papain and triton x-100 // Biochim Biophys Acta. 1975. V. 375. № 1. P. 236–248.
- Membrane digestion. New facts and concepts / Ed. Ugolev A.M. Moscow: Mir Publ., 1989. 288 p.
- Michałowicz J., Duda W. Phenols – sources and toxicity // Polish J. Environ. Stud. 2007. V. 16. № 3. P. 347–362.
- Monod J., Wyman J., Changeux J.-P. On the nature of allosteric transitions: A plausible model // J. Mol. Biol. 1965. V. 12. № 1. P. 88–118.
- Waluga D. Phenol-induced changes in the peripheral blood of the breams (*Abramis brama* L.) // Acta Hydrobiol. 1966. V. 8B. P. 87–95.
- Zaki M.S., Fawzi O.M., Shalaby S.I. Phenol toxicity affecting hematological changes in cat fish // Life Sci. J. 2011. V. 8. № 2. P. 244–248.

Influence of Amorphous Phenol and Its Fractions on the Activity of Fish Intestinal Peptidases

V. V. Kuzmina¹ and A. F. Tarleva^{1, #}

¹*Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, pos. Borok, Nekouz district, Yaroslavl region, 152742 Russia*
[#]*e-mail: ko6ka_85@mail.ru*

In the study of 7 species of freshwater bony fish: carp *Cyprinus carpio* L., bream *Abramis brama* (L.), white bream *Blicca bjoerkna* (L.), rouch *Rutilus rutilus* (L.), perca *Perca fluviatilis* L. sander *Zander lucioperca* (L.) and, it was shown that *in vitro* the effects of amorphous phenol, as well as its liquid fractions, formed after 12 months after production, are species-specific and depend on the concentration of phenol and the localization of peptidases.