

УДК 597.504.4.054

ВПЛИВ СУБЛЕТАЛЬНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ СВИНЦЮ НА АКТИВНІСТЬ ТРАВЛЕННЯ ЦЬОГОРІЧОК КОРОПІВ

Ю. Забитівський

*Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Драгоманова 17а, м. Львів 79005, Україна,
e-mail: ndl41@franko.lviv.ua*

Вплив сублетальних концентрацій нітрату свинцю на травлення цьогорічок коропів простежується в розподілі активності карбогідраз, що мають різне походження і беруть участь у мембранному та порожнинному гідролізі. Концентрація свинцю у воді 0,2 мг/л зумовлює стресову ситуацію в риб, яка триває три доби, після чого настає адаптація. Свинець концентрацією 5 мг/л є стресором після першої доби для карбогідраз мембранного походження, після восьми діб у проксимальному відділі деформуються мікрроворсинки та погіршуються гідролітично-транспортні процеси, однак медіальна ділянка є стійкою до токсикації. Порожнинне травлення інгібується.

Ключові слова: короп, свинець, карбогідрози, травлення.

Наявність і тенденція до збільшення вмісту свинцю у внутрішніх водах дає підстави для глибшого аналізу впливу цього хімічного елемента на риб, які становлять найвищу ланку харчового ланцюга гідробіоценозів. Свинець перебуває в водоймах у вигляді малорухомих органічних і неорганічних комплексних сполук. Проте внаслідок гідрохімічних і мікробіологічних процесів певна кількість цього металу стає рухомою [1, 2]. Навіть невелика його концентрація (8 мкг/л) за хронічного впливу призводить до морфологічних і біохімічних змін в організмі коропа [3, 4]. Хронічна дія сублетальної та півлетальної концентрації свинцю є причиною перебудови активностей ферментів травної системи [5].

Активності ферментів у різних ділянках кишківника мають видоспецифічне значення [6]. Добовими та сезонними дослідженнями виявлено, що організм риб реагує відповідною амплітудою коливань активностей карбогідраз на умови їхнього утримування [7].

У кишківнику риб під час дії токсиканта накладаються два процеси – деструкції, з одного боку, та регенерації і репарації, – з іншого [8]. Нашою метою було виявлення рівня і способу вираження компенсаторних реакцій травної системи на токсичний вплив сублетальних концентрацій свинцю. Є підстави вважати, що розподіл активностей карбогідраз кишківника – чутливий показник функціонального стану травної системи коропа.

Матеріалом для дослідження були 35 екземплярів цьогорічок лускатого коропа та результати 2596 біохімічних аналізів. Токсичність металу виявляли у короткотермінових [9, 10] дослідях. Цьогорічок середньою масою 14 г утримували в акваріумах об'ємом 100 л за температури 16–19°C, рН 7,0–7,3; вміст йонів Pb^{2+} 0,2 та 5,0 мг/л, що відповідало 2 і 50 рибогосподарським ГДК [11]. Щоденно риб пересажували в свіжоприготовлений розчин металу.

З метою отримання фермент-активного препарату використовували метод солюбілізації ензимів із фрагментів кишківника [12,13] для визначення мембранної активності і метод перфузії [14, 15] для визначення порожнинної активності. Солюбілізацію відрізків кишківника провадили в розведеному на розчині Рінгера з 0,01% тритоном X-100 1% розчині крохмалю. Солюбілізація та інкубація фермент-субстратного комплексу тривала 5, 30 та 60 хв при температурі 37°C. Швидкість перфузії становила 1 мл/с. Інкубація перфузованого ферментного препарату з розчином крохмалю тривала 30 хв при тій же температурі. Активність карбогідраз виражали кількістю мкг глюкози, які утворились за хвилину, на міліграм білка в реакційній суміші. Вміст глюкози визначали ортотолуїдиновим методом [16], білка – методом Лоурі. Результати дослідів опрацьовані методами варіаційної статистики [17].

Приготування зрізів для мікроскопічних досліджень та їхнє фотографування виконано співробітником міжфакультетської лабораторії електронної мікроскопії Львівського національного університету імені Івана Франка – О.Р. Кулачковським.

Шляхом різнотермінової солюбілізації в розчин субстрату потрапляють карбогідрози різної локалізації та походження, які беруть участь у мембранному травленні [12, 18]. Відомо, що функціональну специфіку ензимів здебільшого визначає їхнє розміщення, про що свідчить збільшення активності панкреатичних карбогідраз, які адсорбувалися з порожнини кишківника на поверхню глікокаліксу [12, 14].

Розглянемо картину активності карбогідраз різної локалізації та походження в кишківнику цьогорічок лускатих коропів під впливом свинцю (концентрація розчину 0,2 мг/л). Аналіз виконано після першої, третьої та сьомої доби інтоксикації.

Активність мембранного травлення відповідає 30,23–391,46 мкг глюкози \times \times мг⁻¹ білка \times хв⁻¹ (далі в тексті – у.о), порожнинного – 18,83–82,57 у.о. Відділи кишківника мають різні регуляторні, адсорбційні й адаптивні можливості (рис. 1).

Із результатів досліджень випливає, що компенсаційні реакції на рівні мембранного травлення по-різному виражаються в трьох ділянках кишківника цьогорічок коропа в процесі інтоксикації свинцем концентрацією 0,2 мг/л. Карбогідрози різної локалізації не однаково реагують на інтоксикацію навіть в одній ділянці кишківника. Порівняльна характеристика активності адсорбованих на поверхні кишківника та порожнинних ферментів свідчить про наявність перерозподілу карбогідраз як прояву компенсаторних реакцій на іон свинцю. Здатність травного тракту перерозподіляти ферменти під впливом зовнішніх чинників простежуються і в інших тварин [13].

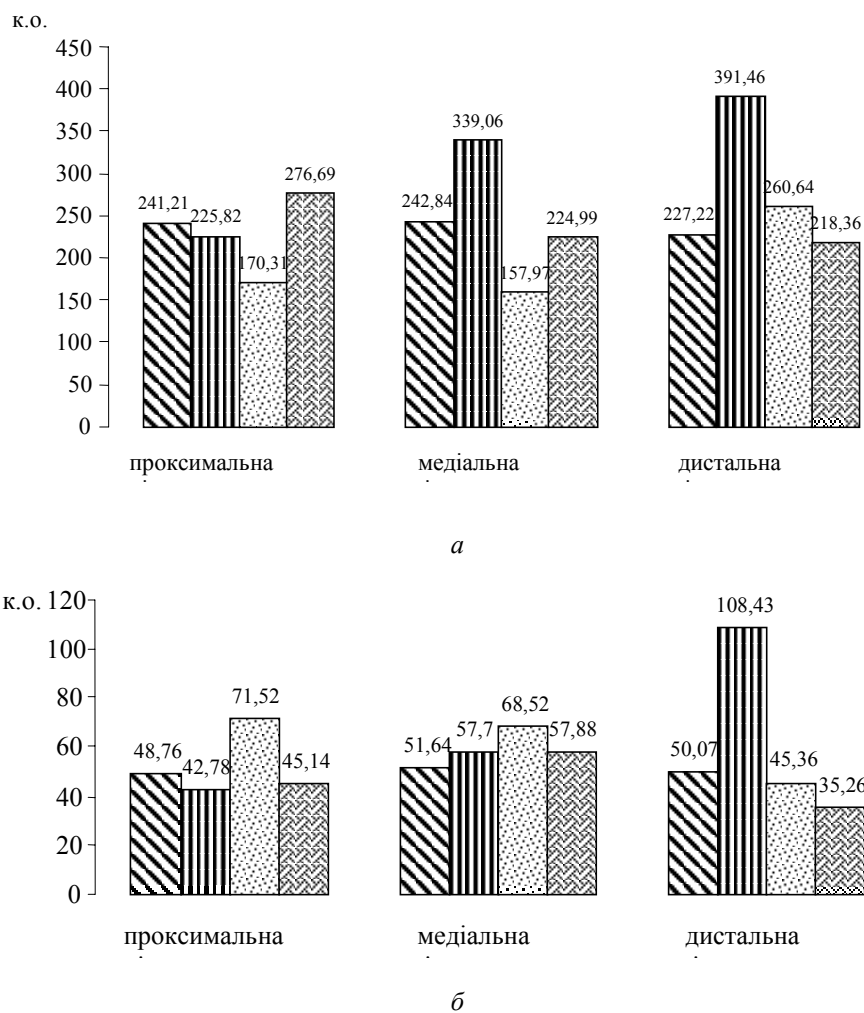


Рис. 1. Динаміка активності карбогідраз у трьох ділянках кишківника лускатих короїв, яких утримували у розчині свинцю концентрацією 0,2 мг/л: *а* – солюбілізованих протягом 5 хв; *б* – солюбілізованих протягом 30 хв; *в* – солюбілізованих протягом 60 хв; *г* – перфузованих із порожнини кишківника.

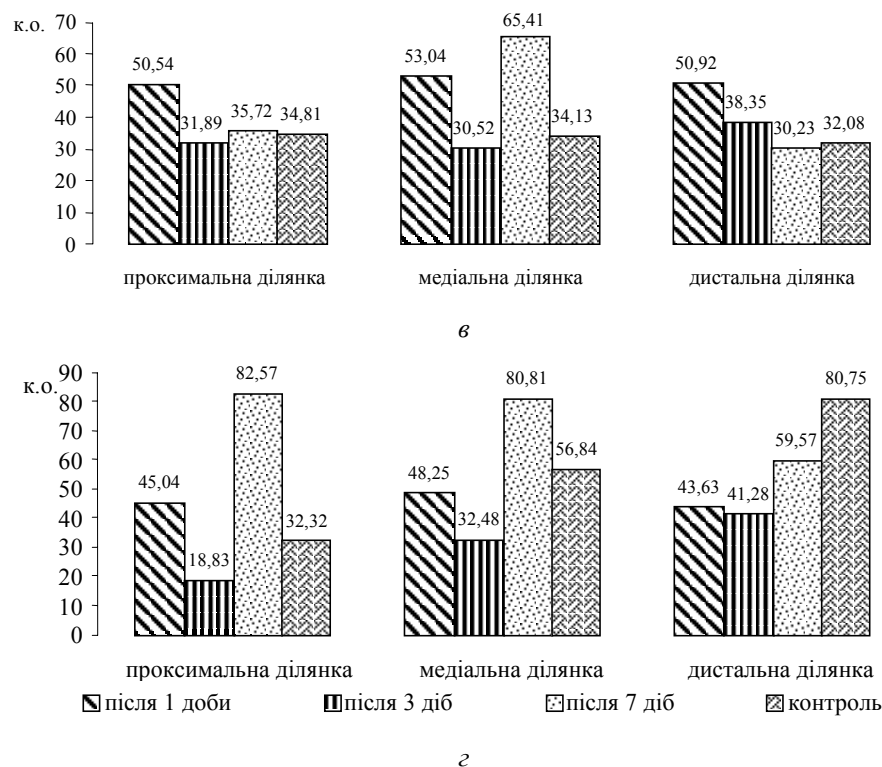


Рис. 1. Закінчення.

Після третьої доби інтоксикації у медіальній та дистальній ділянках унаслідок перерозподілу між поверхнево-адсорбованими та порожнинними карбогідразами підвищується активність мембранного й знижується активність порожнинного травлення. Можливо, це пов'язано з послабленим синтезом панкреатичних ферментів і їхньою швидкою адсорбцією на мембранні структури.

Після сьомої доби в проксимальній та медіальній ділянках перерозподіл спрямований до активації порожнинного травлення. Очевидно, це зумовлено зниженою адсорбцією панкреатичних ферментів на поверхню глікокаліксу.

Активність ферментів, безпосередньо пов'язаних із мембраною, які солюбілізувалися 60 хв, свідчить, що після добової інтоксикації настає посилений синтез карбогідроз ентероцитарного походження. У цей же період активність порожнинних карбогідроз у проксимальній та дистальній ділянках не змінюється. Зростає активність примембранного гідролізу, що не дуже суттєво впливає на діяльність ферментів у глибині глікокаліксу. Після трьох діб токсикації настає адаптаційне вирівнювання активності мембранних карбогідроз до рівня контролю.

Подальша токсикація активує діяльність мембранних ферментів проксимальної та медіальної ділянок, які солюбілізувалися протягом 30 хв, що зумовлює пік мембранної активності карбогідраз.

Наведені вище результати засвідчують, що свинець концентрацією 0,2 мг/л виступає стресовим чинником для травної системи риб. У відповідь на це підвищується синтез карбогідраз ентероцитарного походження у всіх ділянках кишківника після першої доби інтоксикації, а також у медіальній ділянці – після сьомої. Очевидно, в перші три доби організм активує травні процеси, які спряжені з мембранним гідролізом і транспортом, тоді як у порожнинному травленні переважно відбуваються процеси інгібування, які досягають піка після третьої доби.

Рівень і спосіб вираження компенсаторних реакцій травної системи коропів свинцем концентрацією 5 мг/л, які визначали після одної, трьох та восьми діб інтоксикації, мають особливості (табл. 1, 2).

Мембранна активність карбогідраз становила 26,01–489,22 у.о., порожнинна – 14,35–107,26 у.о. Як у випадку з концентрацією свинцю 0,2 мг/л, широкі межі відповіді травного тракту зумовлені відмінними функціональними й, відповідно, пристосувальними властивостями ділянок уздовж кишківника.

На відміну від токсикації низькою концентрацією свинцю, вже після першої доби простежується високий рівень компенсаційних реакцій усієї травної системи. Це виражене зростанням активності мембранних карбогідраз різної локалізації у всіх ділянках кишківника, а також інтенсивним виділенням великої кількості карбогідраз у порожнину кишківника, що спричиняє збільшення активності порожнинного травлення. Підвищення активності адсорбованих на поверхню глікокаліксу карбогідраз відбувається внаслідок активної адсорбції порожнинних ферментів на поверхню глікокаліксу, з одного боку, й міграції ентероцитарних у його товщу, – з іншого.

Після третьої доби різко послаблюється активність поверхнево-адсорбованих карбогідраз у всіх ділянках кишківника до рівня, який є у контрольних риб. Це можна пояснити порушенням сорбційної здатності глікокаліксу. Активність порожнинних карбогідраз медіального та дистального відділів низька, водночас зросла активність ферментів у глікокаліксі та в мембранах. Очевидно, для нормалізації поверхневого гідролізу на структурах глікокаліксу поповнення ферментного складу відбувається з ферментів ентероцитарного походження. Про зниження сорбційної здатності глікокаліксу свідчить той факт, що з підвищенням активності порожнинних карбогідраз проксимальної ділянки активність адсорбованих там ферментів послаблюється.

Не всі ферменти, які беруть участь у мембранному травленні, реагують на отруєння організму. В солюбілізованих протягом 5 та 30 хв карбогідраз із вистальної ділянки зафіксовано підвищення активності порівняно з контролем, тоді як у всіх ферментів, солюбілізованих із медіальної ділянки, рівень активності після восьмої доби не має достовірної відмінності від контрольного. Очевидно, після

тривалості дії високої концентрації свинцю травна система активує систему захисту, дію якої видно на прикладі перших двох груп ферментів із медіального та дистального відділів. Адсорбційна здатність глікокаліксу щодо порожнинних карбогідроз активується. Це пояснює відносну стабільність активності мембранних карбогідроз, солюбілізованих протягом 5 хв. З іншого боку, простежується порушення гідролітично-транспортних процесів, про що свідчить спад активності поверхнево-адсорбованих карбогідроз у проксимальному відділі, мала активність карбогідроз, солюбілізованих протягом 60 хв, а також наявність великої кількості ендоцитозних візікул у цитоплазмі ентероцитів із проксимальної ділянки, чого не було у контрольних риб (рис. 2, 3).

Таблиця 1

Активність мембранних карбогідроз (мкг глюкози \times хв⁻¹ \times мг⁻¹ білка) лускатих коропів, яких витримували у розчині солі, де концентрація Рb²⁺ становила 5 мг/л, $N = 15$, $M \pm m$, $p < 0,001$

Стат.	Тривалість солюбізації, хв								
	5			30			60		
Показ.	1*	2	3	1	2	3	1	2	3
Після одної доби									
$M \pm m$	270,46 ± 2,83	406,02 ± 40,19	489,22 ± 57,07	66,47 ± 3,06	82,28 ± 6,87	140,03 ± 7,93	47,43 ± 2,60	55,08 ± 3,59	50,80 ± 2,78
Після трьох діб									
$M \pm m$	177,94 ± 6,65	215,49 ± 5,80	273,24 ± 14,88	68,87 ± 7,42	81,66 ± 6,24	77,53 ± 4,35	58,10 ± 3,57	60,55 ± 2,01	70,74 ± 3,26
Після восьми діб									
$M \pm m$	168,13 ± 9,45	229,21 ± 9,46	271,07 ± 14,55	41,09 ± 2,39	56,96 ± 1,82	108,45 ± 4,27	30,63 ± 1,47	28,65 ± 0,55	26,01 ± 1,20
Контроль									
$M \pm m$	276,69 ± 43,86	224,99 ± 23,06	218,36 ± 26,25	45,14 ± 6,49	57,88 ± 7,61	35,26 ± 1,33	34,81 ± 2,34	34,13 ± 4,15	32,08 ± 8,15

Примітка: * 1, 2, 3 - проксимальна, медіальна та дистальна ділянки кишківника.

Таблиця 2

Активність порожнинних карбогідраз (мкг глюкози \times хв⁻¹ \times мг⁻¹ білка)
цьогорічок лускатих коропів, яких витримували у розчині солі, де
концентрація Pb²⁺ становила 5 мг/л, $N = 15$, $M \pm m$, $p < 0,001$

Стат. показ.	Ділянка		
	Проксимальна	Медіальна	Дистальна
	Після одної доби		
$M \pm m$	32,82 \pm 3,31	106,02 \pm 13,03	107,26 \pm 19,19
	Після трьох діб		
$M \pm m$	45,60 \pm 3,17	17,30 \pm 1,14	14,58 \pm 0,73
	Після восьми діб		
$M \pm m$	14,35 \pm 0,89	14,20 \pm 0,65	17,95 \pm 1,33
	Контроль		
$M \pm m$	32,32 \pm 2,51	56,84 \pm 8,99	80,75 \pm 18,45

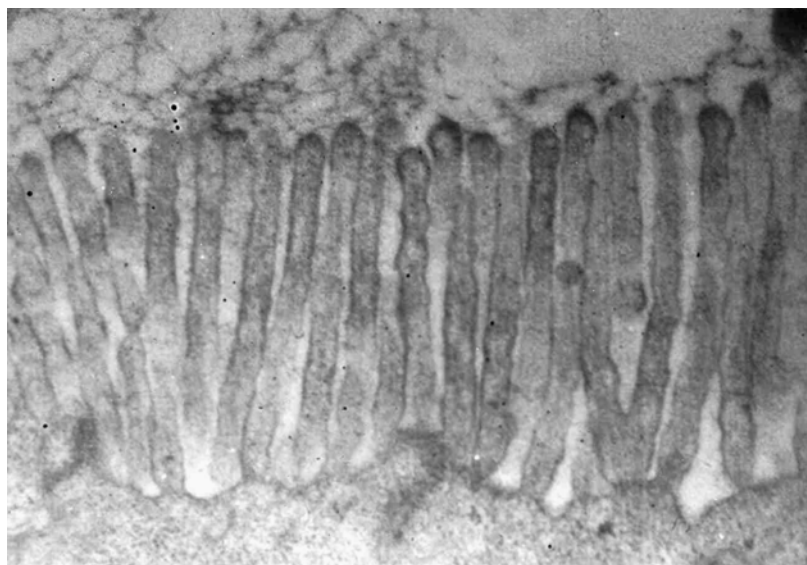


Рис. 2. Мікроворсинки та верхня ділянка цитоплазми без везикул у ентероцитах проксимального відділу кишківника контрольних лускатих коропів. $\times 40\ 000$.

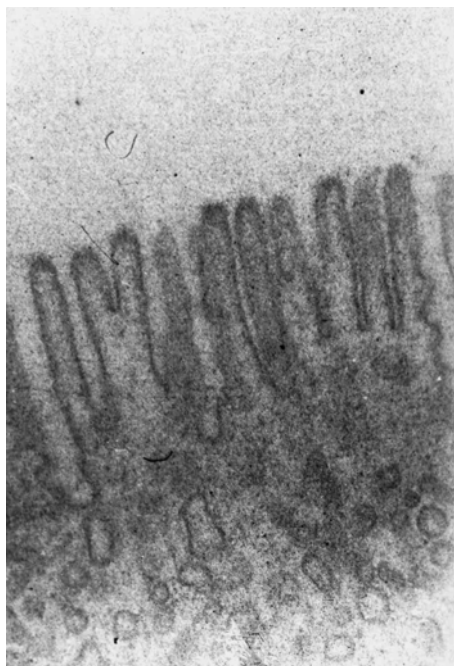


Рис. 3. Деформація мікрворсинок і утворення ендоцитозних везикул у цитоплазмі ентероцитів проксимального відділу кишківника лускатих коропів, яких утримували в розчині концентрацією Pb^{2+} 5 мг/л протягом восьми діб. $\times 45000$.

Наявність везикул засвідчує посилення активності ендоцитозу, який є одним із варіантів транспорту поживних речовин у клітину. Як звичайно, він відіграє незначну роль у процесах травлення риб [18]. Активація цього процесу може відображати порушення в системі гідролізу й транспорту карбогідраз, про що свідчить великий спад активності мембранних карбогідраз, які солюбілізувалися протягом 30–60 хв після восьмидобової експозиції риб у розчині солі металу.

Ворсинки в контрольних риб відрізняються від дослідних дещо булавоподібною формою. Подібне явище простежується у разі порушення термінальної сітки актинового волокна [18].

Очевидно, активність ферментів із проксимального відділу є чутливим індикатором отруєння організму риб упродовж восьми діб інтоксикації.

Унаслідок порівняння впливу свинцю різних концентрацій у воді на цього-річок коропів виявлено таке. Після третьої доби як при 2, так і при 50 ГДК свинцю

адаптаційні зміни в діяльності травного тракту виражаються зниженням порожнинної активності майже у всіх ділянках кишківника та зміною сорбційної здатності мембранних структур. Мембранні структури при 2 ГДК свинцю активуються в медіальній та дистальній ділянках, що призводить до підвищення активності мембранних ферментів, адсорбованих на поверхню глікокаліксу. При 50 ГДК сорбційна здатність мембрани порушується і для нормалізації травних процесів на межі порожнини й слизової кишківника, активується синтез карбогідраз ентероцитарного походження, які мігрують у шар глікокаліксу та на його поверхню.

Свинець концентрацією 2 та 50 ГДК впливає на зростання активності ферментів, що солубілізувалися 60 хв у всіх ділянках після першої доби. Після трьох діб інтоксикації концентрацією 0,2 мг/л активність цих ферментів спадає до рівня контролю, а при 5 мг/л вона зростає, досягаючи піка у всіх ділянках кишківника. Також після сьомої доби при 2 ГДК свинцю рівень активності є в межах контрольних показників у всіх ділянках, окрім медіального, де утворюється другий пік, а при 50 ГДК – у всіх ділянках настає інгібування. Активність порожнинного травлення після семи діб інтоксикації свинцем кількістю 2 ГДК зростає, а при 50 ГДК – інгібується.

Травна система є індикатором рівня токсичного впливу, оскільки для високих сублетальних концентрацій характерна інша картина розподілу активності травних ферментів, що дає змогу передбачити рівень виснаження організму. Карбогідразна активність мембранного та порожнинного травлення – це елемент біохімічного статусу організму коропа за умов впливу на нього екстремальних за силою екологічних чинників середовища. В біологічній регламентації токсичних речовин, які надходять в рибничі стави, за допомогою ГДК, цей показник доцільно використовувати.

-
1. *Линник П.Н.* Донные отложения водоемов как потенциальный источник вторичного загрязнения водной среды соединениями тяжелых металлов // Гидробиол. журнал. 1999. Т. 35. № 2. С. 97-109.
 2. *Леонова Г.А., Ломоносов И.С., Сутурин А.Н., Шепотько А.О.* Токсическое влияние свинца на гидробионты и водоплавающих птиц (обзор) // Гидробиол. журн. 1992. Т.28. N 4. С. 68-75.
 3. *Столяр О.Б., Курант В.З., Хоменчук В.А., Балабан Р.Б.* Влияние сублетальных концентраций свинца на содержание тиоловых соединений и белков в организме карпа // Гидробиол. журн. 1999. Т.35. N 6. С. 63-68.
 4. *Гандзюра В.П., Игнатюк А.А.*, Влияние ионов свинца и аммония на биорыбопродуктивные параметры молоди рыб // Гидробиол.журн. 1998. Т. 34. N 1. С. 85–90.
 5. *Sastry K.V., Gupta P.K.* Alteration in the activities of a dehydrogenases in the digestive system of two teleost fishes exposed to lead nitrate. // *Ecotoxicol Environ Saf*, 1980. Vol. 4. N 3. P. 232–239.

6. Кузьмина В.В. Распределение активности карбогидраз вдоль кишечника у некоторых видов пресноводных рыб // Вопросы ихтиологии. 1985. Т. 25. № 4. С. 674-679.
7. Неваленный А.Н., Егоров С.Н. Суточная динамика суммарной карбо-гидразной активности кишечника карпа *Cyprinus carpio*, выращиваемого в прудовых условиях // Вопр. ихтиологии. 1995. Т. 35. № 4. С. 549–552.
8. Филенко О.Ф. Водная токсикология. М.: Изд-во Москов. ун-та, 1988. 154 с.
9. Лукьяненко В.И., Карнович Т.А. Биотестирование на рыбах /Методические рекомендации. Рыбинск. 1989. 96 с.
10. Лукьяненко В.И. Экологическая биохимия водных животных; проблемы и перспективы развития // Гидробиол. журн. 1992. Т. 28, № 5. С. 33–44.
11. Приложение к указанию МЭП от ноября 1990 г. N У-342. Обобщенный перечень предельнодопустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоемов. М., 1990. 48 с.
12. Кушак Р.И. Пищеварительно-транспортная система энтероцитов. Рига: Зинатне, 1983. 304 с.
13. Мембранный гидролиз и транспорт: Новые данные и гипотезы/ под ред. А.М.Уголева, Л., 1986. 240 с.
14. Сорвачев К.Ф. Основы биохимии питания рыб. М., 1982. 247 с.
15. Соболев Л.Б. Морфофункциональная характеристика пищеварительной системы молоди карпа, выращиваемой в прудах/ Автореф. дисс....канд. биол. наук. М., 1991. С. 23
16. Сухомлинов Б.Ф., Чайка Я.П., Коробов В.Н. Методические указания к лабораторным занятиям по физико-химическим методам современной биохимии для студентов биологического факультета. Львов, 1987.
17. Деркач М., Гумецький Р., Чабан М. Курс біометрії. Львів: Вища школа, 1974. 73 с.
18. Морозов И.А., Лысиков Ю.А., Питран Б.В., Хвыля С.И. Всасывание и секреция в тонкой кишке (субмикроскопические аспекты). М., 1988. 220 с.

**THE EFFECTS OF LEAD NITRATE SUBLETHAL
CONCENTRATIONS ON THE DIGESTIVE ACTIVITY OF ONE-
YEAR CARPS**

Y. Zabytivskiy

*Ivan Franko National University of L'viv,
Drahomanova st. 17a, L'viv 79005, Ukraine,
e-mail: ndl41@franco.lviv.ua*

The effects of lead nitrate sublethal concentrations on the digestion of one-year carps is expressed in activity distribution of carbohydrases, which have different origination and take part in the processes of membrane and cavity hydrolyses. The concentration of lead in the water up to 0.2 mg/l causes stress state in the fishes, which continues for three days, afterwards the state of adaptation comes. The lead in the concentration of 5 mg/l is a stressor for carbohydrases of membrane origination after first day of exposure, deformation of microvilli is occurring after eighth day of the exposure, also hydrolytical and transport processes are going worse but medial part remains resistant to the intoxication. Cavity digestion is inhibited.

Keywords: carp, lead, carbohydrases, digestion.

Стаття надійшла до редколегії 30.06.2002

Прийнята до друку 16.07.2002