

УДК 597.554.3:591. 132.05:547.56

ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДАЗ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ И ХИМУСА У РЫБ

¹Кузьмина В.В., ²Грачева Е.Л., ¹Тарлева А.Ф.

¹Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина, 152742 пос. Борок
Ярославской обл.; ²Ярославский госуниверситет им. П.Г. Демидова,
150000 Ярославль, Российская Федерация

Сброс фенольных вод в водоемы вызывает значительное изменение режима биогенных элементов, содержания кислорода и углекислого газа, а также оказывает негативное влияние на гидробионтов. Цель работы – изучение в условиях *in vitro* влияния фенола и его производных на активность трипсино- и химотрипсиноподобных пептидаз пищеварительного тракта у рыб разных видов. Объекты исследования: лещ *Abramis brama* (L.), густера *Blicca bjoerkna* (L.), плотва *Rutilus rutilus* (L.), речной окунь *Perca fluviatilis* L. из Рыбинского водохранилища, а также прудовый карась *Carassius carassius* (L.). Оценивали казеинлитическую (преимущественно активность трипсина) и гемоглобинлитическую активность (преимущественно активность химотрипсина) слизистой кишечника и химуса при инкубации гомогенатов в присутствии фенола и его производных (4-хлорфенол, 4-нитрофенол, 2,4-динитрофенол) в концентрации 1 ммоль/л. Фенол и его производные вызывают значительное снижение активности казеин- и гемоглобинлитических пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб разных видов. Степень снижения ферментативной активности зависит от локализации пептидаз и вида рыб.

Ключевые слова: рыбы, ксенобиотики, производные фенола, пищеварение, пептидазы

Проблемы биологии продуктивных животных, 2015, 3: 59-67

Введение

В водной среде фенолы образуются в процессе метаболизма растительных и животных организмов, а также при распаде и трансформации органических веществ (Запрометов, 1974; Michałowicz, Duda, 2007). Образующиеся в воде и в донных отложениях фенолы обычно не представляют опасности для экосистем (Запрометов, 1974). Однако при увеличении в водной среде концентрации фенола и его производных они становятся опасными для гидробионтов. Известно, что при строительстве гидроэлектростанций под воду часто уходят лесные массивы. Затопленная древесина под действием грибов и бактерий разлагается, а продукты её разложения, в частности фенолы, присутствующие в древесине в свободном и в связанном состоянии, оказываются токсичными. В частности, в настоящее время фенолы представляют собой одну из основных групп веществ, загрязняющих Енисей (Спицина и др., 2006; Сурсякова и др., 2011).

В условиях значительного антропогенного загрязнения водоемов возрастает актуальность исследования влияния токсических веществ на рыб (Алабастер, Ллойд, 1984; Решетников, Шатуновский, 1997; Немова, Высоцкая, 2004). При этом наибольшего внимания заслуживают такие органические вещества, как фенолы, загрязняющие окружающую среду в результате деятельности промышленных производств. Фенолы используются в химической промышленности в качестве компонентов или предшественников синтетических смол, пластификаторов, поверхностно-активных и дубильных веществ, ядохимикатов, стабилизаторов, антисептиков и других веществ (Харлампович, Чуркин, 1974; Michałowicz, 2005). Однако в наибольших концентрациях фенолы поступают в воду со стоками предприятий нефте- и

сланцеперерабатывающей, коксо- и лесохимической, а также анилинокрасочной промышленности (Алабастер, Ллойд, 1984; Michałowicz, Duda, 2007).

Помимо этого, некоторые фенолы, в частности 2,4-динитрофенол, используются в сельском хозяйстве в составе различных пестицидов: инсектицидов, фунгицидов и гербицидов (De Felice, Ferreira, 2006). При этом уже при концентрации 75 мг/л фенол тормозит процесс биологической очистки в водоеме (Запрометов, 1974). Это дает основание считать, что они относятся к числу наиболее опасных для гидробионтов соединений (Алабастер, Ллойд, 1984; Немова, Высоцкая, 2004). Наиболее токсичны нитрофенольные соединения (Степановских, 2000). Сброс фенольных вод в водоемы вызывает значительное изменение режима биогенных элементов, содержания кислорода и углекислого газа, а также оказывает негативное влияние на гидробионтов (Романенко и др., 1990), причем рыбы наиболее чувствительны к воздействию фенола (Lewis et al., 1995).

В ряде исследований показано, что фенол является нервно-паралитическим ядом, вызывающим наиболее резкие нарушения функций центральной нервной системы. Помимо этого отмечены изменения в других системах организма (Лукьяненко, 1983; Флеров, 1989). Так, известно, что фенолы оказывают гемо- и гепатотоксическое действие на организм, а также провоцируют мутагенез и канцерогенез (Michałowicz, Duda, 2007). Сведения о влиянии фенола и его производных на активность пищеварительных ферментов у рыб до начала нашей работы отсутствовали. Однако от эффективности функционирования ферментных систем пищеварительного тракта зависит не только жизнеспособность рыб, но и товарные качества рыбной продукции.

Цель работы – изучение влияния в условиях *in vitro* фенола и его производных на активность трипсино- и химотрипсиноподобных пептидаз пищеварительного тракта, обеспечивающих гидролиз белковых компонентов пищи у рыб разных видов.

Материал и методы

Объекты исследования: лещ *Abramis brama* (L.) массой 300-325 г, густера *Blicca bjoerkna* (L.) массой 280-320 г, плотва *Rutilus rutilus* (L.) массой 160-210 г и речной окунь *Perca fluviatilis* L. массой 50-70 г из Рыбинского водохранилища, а также прудовый карась *Carassius carassius* (L.) массой 10-15 г.

Рыб после поимки в течение 1 ч доставляли в лабораторию. Сразу проводили биоанализ, изымали пищеварительный тракт и замораживали. Для получения ферментативно активных препаратов кишечник рыб помещали на ледяную баню, очищали от жира, разрезали вдоль, изымали содержимое, а затем специальным скребком снимали слизистую оболочку кишечника. Слизистую оболочку и содержимое (химус) от 5 экз. рыб каждого вида тщательно перемешивали, затем отбирали требуемое количество материала для приготовления исходного гомогената. Слизистую или химус гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с небольшим количеством раствора Рингера для холоднокровных животных (103 мМ NaCl, 1.9 мМ KCl, 0.45 мМ CaCl₂) при температуре 0-4°C. Для этого стеклянный гомогенизатор помещали в стакан со льдом; полученный гомогенат дополнительно разводили раствором Рингера до конечного разведения 1:99. Из-за трудностей отделения слизистой оболочки и отсутствия химуса у карасей в работе была использована целая кишка.

Для оценки влияния фенола и его производных на активность трипсино- и химотрипсиноподобных пептидаз вначале инкубировали 0.25 мл гомогената с 0.25 мл одного из токсикантов в концентрации 2 ммоль/л. При этом концентрация токсикантов уменьшалась в два раза (до 1 ммоль/л). Через 1 ч после начала прединкубации к первичному инкубату добавляли 0.5 мл субстрата и смесь инкубировали еще 30 мин. Все операции проводили при температуре 20°C и непрерывном перемешивании. Казеинлитическую активность (преимущественно, активность трипсина, КФ 3.4.21.4) и гемоглобинлитическую активность (преимущественно, активность химотрипсина КФ 3.4.21.1) оценивали по увеличению концентрации тирозина,

который определяли методом Ансона (Anson, 1938) в некоторой модификации. В качестве субстратов использовали 1% раствор казеина или гемоглобина (рН 7.4). Активность ферментов определяли в 5 повторностях. Об уровне ферментативной активности судили по приросту продуктов реакции за 1 мин инкубации субстрата и ферментативно активного препарата с учётом фона (количество тирозина в исходном гомогенате) в расчёте на 1 г сырой массы ткани. Интенсивность окрашивания определяли на фотоколориметре (КФК-2) при красном светофильтре, $\lambda=670$ нм.

Результаты и обсуждение

Казеинлитическая активность пептидаз слизистой оболочки кишечника рыб. Казеинлитическая активность пептидаз слизистой оболочки кишечника у рыб разных видов варьирует незначительно (табл. 1). Активность казеинлитических пептидаз слизистой оболочки кишечника максимальна у контрольных особей плотвы. Уровень ферментативной активности у контрольных особей карася, густеры, леща и окуня в 1.4, 1.6, 1.7 и 2 раза соответственно ниже, чем у плотвы. Фенол практически не влияет на активность пептидаз слизистой оболочки плотвы, но существенно ($P<0.05$) снижает ферментативную активность у рыб других видов. Максимальное снижение активности пептидаз выявлено у карася (почти на 70%). Под влиянием производных фенола у леща, густеры и окуня наблюдается последовательное увеличение их ингибирующего эффекта в ряду: 4-хлорфенол \rightarrow 4-нитрофенол \rightarrow 2,4-динитрофенол по сравнению с таковым фенола у густеры при отсутствии существенных различий у плотвы и карася. У леща эффекты 4-нитрофенола ниже таковых 4-хлорфенола и 2,4-динитрофенола. Для окуня характерно наиболее значительное снижение активности пептидаз в присутствии 2,4-динитрофенола.

Таблица 1. Влияние фенола и его производных в концентрации 1 ммоль/л на активность казеинлитических пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб Рыбинского водохранилища (M \pm m, n=5)

Фенол и его производные	Ферментативная активность, мкмоль/(г·мин)				
	Лещ	Густера	Плотва	Карась ⁺	Окунь
	Слизистая оболочка				
0	1.88 \pm 0.20	2.00 \pm 0.11	3.21 \pm 0.18	2.27 \pm 0.24	1.61 \pm 0.11
Фенол	1.22 \pm 0.07*	1.57 \pm 0.06*	3.13 \pm 0.20	0.70 \pm 0.09*	1.14 \pm 0.07*
4-хлорфенол	1.00 \pm 0.19*	1.25 \pm 0.09*	2.25 \pm 0.09*	0.67 \pm 0.09*	1.25 \pm 0.05*
4-нитрофенол	1.06 \pm 0.17*	0.82 \pm 0.07*	2.47 \pm 0.09*	0.70 \pm 0.07*	1.14 \pm 0.07*
2,4-динитрофенол	0.94 \pm 0.21*	0.59 \pm 0.06*	2.35 \pm 0.14*	0.67 \pm 0.10*	0.98 \pm 0.06*
	Химус				
0	1.53 \pm 0.23	2.31 \pm 0.07	1.53 \pm 0.07	-	1.76 \pm 0.09
Фенол	1.33 \pm 0.04	2.20 \pm 0.07	1.49 \pm 0.05	-	1.25 \pm 0.18*
4-хлорфенол	1.18 \pm 0.09	2.00 \pm 0.07*	1.18 \pm 0.09*	-	0.74 \pm 0.07*
4-нитрофенол	0.71 \pm 0.07*	1.37 \pm 0.1*	0.98 \pm 0.06*	-	0.74 \pm 0.07*
2,4-динитрофенол	1.10 \pm 0.13*	1.45 \pm 0.08*	0.78 \pm 0.06*	-	0.98 \pm 0.09*

Примечания: здесь и в таблицах: *P < 0.05 по t-критерию при сравнении с контролем;
⁺использована вся кишка.

Казеинлитическая активность пептидаз химуса у контрольных особей различается в меньшей степени по сравнению с таковой слизистой оболочки. У контрольных особей леща и плотвы уровень активности пептидаз ниже, чем у густеры в 1.5, у окуня – в 1.3 раза. Данные, касающиеся влияния фенола и его производных на казеинлитическую активность пептидаз химуса у исследуемых видов отличаются от описанных выше результатов. Под действием фенола активность пептидаз наименее значительно снижается у плотвы и густеры, наиболее значительно – у окуня. Под влиянием производных фенола ингибирующий эффект увеличивается у всех видов рыб. Для плотвы характерно последовательное увеличение ингибирующей

шего эффекта в ряду: 4-хлорфенол → 4-нитрофенол → 2,4-динитрофенол по сравнению с таковым фенола. У леща максимальный ингибирующий эффект отмечен при действии 4-нитрофенола, у густеры – 4-нитрофенола и 2,4-динитрофенола, у окуня – 4-хлорфенола и 4-нитрофенола.

Гемоглобинлитическая активность пептидаз слизистой оболочки кишечника рыб. Активность гемоглобинлитических пептидаз слизистой оболочки у контрольных особей рыб тех же видов варьирует более значительно по сравнению с таковой казеинлитических пептидаз (табл. 2). Максимальный уровень активности пептидаз слизистой оболочки у леща превышает минимальную активность у густеры в 2.3 раза. Величины активности пептидаз у окуня, плотвы и карася достаточно схожи. Под действием фенола минимальное уменьшение ферментативной активности наблюдается у леща, максимальное ($P < 0.05$) – у густеры. 4-хлорфенол заметно уменьшает активность пептидаз слизистой у всех видов рыб, особенно у густеры и плотвы. Под влиянием 4-нитрофенола и 2,4-динитрофенола наблюдается существенное ($P < 0.05$) снижение ферментативной активности у всех исследованных видов рыб.

Таблица 2. Влияние фенола и его производных в концентрации 1 ммоль/л на активность гемоглобинлитических пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб Рыбинского водохранилища ($M \pm m$, $n=5$)

Фенол и его производные	Ферментативная активность, мкмоль/(г·мин)				
	Лещ	Густера	Плотва	Карась*	Окунь
	Слизистая оболочка				
0	1.72±0.11	0.74±0.13	1.33±0.07	1.49±0.01	1.29±0.10
Фенол	1.69±0.08	0.39±0.06*	1.18±0.18	1.37±0.16	1.10±0.18
4-хлорфенол	1.49±0.16	0.35±0.04*	0.78±0.07*	1.21±0.16	0.86±0.10*
4-нитрофенол	1.41±0.11*	0.31±0.08*	0.71±0.08*	0.98±0.13*	0.86±0.10*
2,4-динитрофенол	1.41±0.14*	0.35±0.07*	0.90±0.10*	0.63±0.16*	0.98±0.14*
	Химус				
0	1.80±0.12	0.55±0.11	1.64±0.10	-	1.76±0.09
Фенол	1.61±0.10	0.43±0.11	1.14±0.13*	-	1.69±0.10
4-хлорфенол	1.41±0.13	0.31±0.08*	0.71±0.10*	-	1.45±0.10
4-нитрофенол	1.61±0.11	0.24±0.04*	0.51±0.08*	-	1.33±0.07*
2,4-динитрофенол	1.21±0.10*	0.24±0.04*	0.51±0.08*	-	1.45±0.10

Уровень активности гемоглобинлитических пептидаз химуса у леща, окуня и плотвы выше, чем у густеры в 2-3 раза. Под действием фенола активность пептидаз химуса у окуня практически не изменяется, у леща незначительно уменьшается. У рыб двух других видов эффекты фенола выражены сильнее, однако существенное ($P < 0.05$) снижение ферментативной активности отмечено только у плотвы. Под действием 4-хлорфенола ферментативная активность заметно уменьшается у всех видов рыб, однако лишь у плотвы и густеры оно статистически значимо ($P < 0.05$). Эффекты 4-нитрофенола и 2,4-динитрофенола у густеры и плотвы одинаковы, в то время как у леща существенное уменьшение активности по сравнению с контролем наблюдается лишь при действии 2,4-динитрофенола. Эффекты 4-нитрофенола и 2,4-динитрофенола у плотвы и густеры схожи. У окуня эффекты 2,4-динитрофенола и 4-хлорфенола примерно одинаковы, в то время как действие 4-нитрофенола выражено сильнее.

При обсуждении полученных результатов следует отметить, что активность казеин- и гемоглобинлитических (трипсино- и химотрипсиноподобных) пептидаз у исследованных видов рыб сопоставима с данными, приведенными в более ранних исследованиях (Kuz'mina et al, 1911; Kuz'mina, Ushakova, 1910, 2013). Особо следует отметить, что уровень активности пептидаз слизистой и химуса у ихтиофага-факультативного бентофага окуня близок к таковому у типичных бентофагов, что, по всей вероятности, связано с тем, что исследованные особи принадлежали к литоральной группе, питающейся бентосом (Poddubny, Galat, 1995).

Также важно подчеркнуть, что изученная концентрация фенола 1 ммоль/л или 94.1 мг/л сопоставима с концентрациями, наблюдающимися при антропогенном загрязнении водоемов, особенно при залповых сбросах промышленных отходов (Лукьяненко, 1983; Алабастер, Ллойд, 1984; Флеров, 1989; Michałowicz, Duda, 2007). Кроме того, заслуживает внимания разная чувствительность отдельных видов рыб к фенолу. Так, у леща, густеры, плотвы и карася, относящихся к одному сем. *Syringidae*, процент торможения активности казеин- и гемоглобинлитических пептидаз, функционирующих в слизистой, под влиянием фенола варьирует в пределах от -2.5 до -69.2% и от -1.8 до -47.3% соответственно. При этом наиболее близкие в систематическом отношении виды – лещ и густера – характеризуются наибольшими различиями по степени влияния фенола на активность гемоглобинлитических пептидаз. Вместе с тем, у карася, плотвы и окуня, в большей степени различающихся по таксономии, чем лещ и густера, процент торможения достаточно схож и варьирует в пределах от -8.1 до -14.8%.

Производные фенола в эквимолярных концентрациях оказывают более выраженный ингибирующий эффект. Чувствительность к 4-хлорфенолу казеинлитических пептидаз слизистой оболочки у рыб разных видов, как правило, в 1.6-8.6, химуса – в 1.7-8.5 раза выше по сравнению с таковой фенола, гемоглобинлитических пептидаз в 1.1-7.4 и в 1.9-3.8 соответственно. Чувствительность казеинлитических пептидаз слизистой оболочки к 4-нитро- и 2,4-динитрофенолу кишечника выше, по сравнению с таковой фенола максимум в 10.7 раза (плотва), химуса – в 18.2 раза (плотва), гемоглобинлитических пептидаз – выше в 10 (лещ) и 5.3 (окунь) раза соответственно. На первый взгляд, эти результаты свидетельствуют о том, что производные фенола более токсичны, чем фенол. Однако в данной работе сопоставлялись эффекты эквимолярных концентраций фенола и его производных. Поскольку молекулярные массы производных фенола в 1.37-1.96 раз выше таковой фенола, то их большее влияние на активность казеин- и гемоглобинлитических пептидаз, скорее всего, связано с их большим весовым содержанием в инкубационной среде (Кузьмина и др., 2014).

Кроме того, заслуживают внимания различия эффектов фенола от места их функционирования: влияние фенола на активность пептидаз химуса у одних и тех же видов может быть слабее, у других – сильнее по сравнению со слизистой оболочкой. Это, по всей вероятности, связано с тем, что в слизистой оболочке кишечника функционирует как пептидазы, адсорбированные из полости, так и собственно кишечные пептидазы, в то время как в полости кишечника доминируют панкреатические по происхождению пептидазы, а также ферменты объектов питания и микробиоты (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005). Также могут существовать различия в составе инкубационных сред, поскольку химус может содержать продукты деградации до сотни различных объектов питания (Иванова и др., 1978; Gerking, 1994). Это обстоятельство позволяет предположить, что некоторые из компонентов химуса могут усиливать или ослаблять влияние фенола и его производных. Действительно, известно о модифицирующем действии на активность гликозидаз и протеаз таких компонентов пищи, как липиды, сахара и аминокислоты (Кузьмина, 1989; Неваленный и др., 2003).

Ранее мы предполагали, что различная степень влияния фенола и его производных на гемоглобинлитические пептидазы у рыб одного и того же вида обусловлена их взаимодействием с разными регуляторными сайтами ферментов, а у рыб разных видов – с различиями по аминокислотному составу и структуре глобул ферментов. При этом фенолы, влияя на регуляторные центры пептидаз, изменяют конформацию их активных центров, в результате чего снижается эффективность взаимодействия ферментов и субстратов (Кузьмина и др., 2014). Полученные в данной работе результаты, по всей вероятности, отражают снижение активности пептидаз под влиянием большого количества фенолов, поступающих в пищеварительный тракт рыб с водой при залповых сбросах промышленных предприятий. В этом случае концентрация фенола и его производных в воде может значительно превышать ПДК для воды рыбохозяйственных водоемов (Лукьяненко, 1983; Алабастер, Ллойд, 1984; Флеров, 1989; Michałowicz, Duda, 2007).

Таким образом, в условиях *in vitro* фенол и его производные в концентрации 1 ммоль/л значительно снижают активность казеин- и гемоглоблилитических пептидаз кишечника у рыб разных видов. Степень их воздействия зависит от вида рыб, а также от локализации фермента (слизистая оболочка или химус). Снижение активности казеин- и гемоглоблилитических пептидаз кишечника может негативно влиять на эффективность начальных этапов ассимиляции белковых компонентов пищи у исследованных и, по-видимому, других видов рыб.

Авторы выражают глубокую благодарность У.Ж. Тажимуратовой и А. А. Горбуновой за техническую помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алабастер Дж., Ллойд Р. Критерии качества воды для пресноводных рыб. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 344 с.
2. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. – М.: Высшая школа, 1974. – 214 с.
3. Иванова М.Н., Половкова С.Н., Кияшко В.И., Баканов А.И. Питание и пищевые взаимоотношения рыб в водохранилищах Волжского каскада // В кн.: Теоретические аспекты рыбохозяйственных исследований водохранилищ (Ред. Н.В.Буторин, А.Г.Поддубный). – Л.: Наука, 1978. – С. 55-77.
4. Кузьмина В.В. Регуляторные свойства ферментов, обеспечивающих процессы мембранного пищеварения у рыб // Журнал общей биологии. – 1987. – Т. 48. – № 6. – С. 828-838.
5. Кузьмина В.В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. – М.: Наука, 2005. – 300 с.
6. Кузьмина В.В., Грачева Е.Л., Тарлева А.Ф., Тажимуратова У.Ж. Влияние фенола и его производных на активность гемоглоблилитических протеаз слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб разных видов // В сб.: Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы. Матер. V Всерос. конф. по водной экотоксикологии. – 2014. – Ч. 2. – С. 62-66.
7. Лукьяненко В.И. Общая ихтиотоксикология. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. – 320 с.
8. Неваленный А.Н., Туктаров А.В., Бедняков Д.А. Функциональная организация и адаптивная регуляция процессов пищеварения у рыб. – Астрахань: АГТУ, 2003. – 152 с.
9. Немова Н.Н., Высоцкая Р.У. Биохимическая индикация состояния рыб. – М.: Наука, 2004. – 210 с.
10. Романенко В.И., Захарова Л.И., Романенко В.А., Гаврилова В.А., Соколова Е.А. Оценка качества воды по микробиологическим показателям в Рыбинском водохранилище у г. Череповца // В сб.: Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. – М.: ВИНТИ, 1990. – С. 24-41.
11. Решетников Ю.С., Шатуновский М.И. Теоретические основы и практические аспекты мониторинга пресноводных экосистем // В кн.: Мониторинг биоразнообразия (Ред. В.Е. Соколов, Ю.С. Решетников, М.И.Шатуновский). – М.: Наука, 1997. – С. 26-32.
12. Степановских А. С. (ред.). Общая экология. – М.: Юнити, – 2000. – 510 с.
13. Спицына Т.П., Хохлова А.И., Степень Р.А. Система количественной оценки степени загрязнения поверхностных вод // Вестник Красноярского государственного университета. Естественные науки. – 2006. – № 5. – С. 120-126.
14. Сурякова В.В., Бондарева Л.Г., Бурмакина Г.В., Рубайло А.И. Новые подходы к выявлению источников поступления фенолов в поверхностные водоёмы // Доклады РАН. – 2011. – Т. 441. – № 6. – С. 767-770.
15. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. – СПб.: Гидрометеоздат, 1993. – 238 с.
16. Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. – СПб.: Наука, 1989. – 144 с.
17. Харлампович Г.Д., Чуркин Ю.В. Фенолы. – М.: Химия, 1974. – 376 с.
18. Gerking S.D. Feeding ecology of fish. New York: Acad. Press, 1994. – 416 p.
19. De Felice F.G., Ferreira S.T. Novel neuroprotective, neuritogenic and anti-amyloidogenic properties of 2,4-dinitrophenol: The gentle face of Janus // IUBMB Life. – 2000. – Vol. 58. – No. 4. – P. 185-191.

20. Kuz'mina V.V., Ushakova N.V. The dependence on temperature and pH of the effects of zinc and copper on proteolytic activities of the digestive tract mucosa in piscivorous fish and their potential preys // *Fish Physiol. Biochem.* – 2010. – Vol. 36. – No. 3. – P. 787-795.
21. Kuz'mina V.V., Ushakova N.V. Influence of temperature and pH on the effects of zinc and copper on proteolytic activities of the intestinal mucosa of planktivorous and benthophagous fishes and their potential preys // *Environ. Toxicol. Chemistry.* – 2013. – Vol. 95. – No.1 – P. 150-162.
22. Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Zolotareva G.V., Sheptitskiy V.A. Influence of pH upon the activity of glycosidases and proteinases of intestinal mucosa, chyme and microbiota in fish // *Fish Physiol. Biochem.* – 2011. – Vol. 37. – No. 3. – P. 345-357.
23. Lewis S., Grimwood M., Comber S., Wroath A., Sutton A. Proposed environmental quality standards for phenol in water. – Bristol: Environment Agency Rio House Waterside Drive Aztec West Almondsbury Publ., 1995. – 100 p.
24. Michałowicz J. The occurrence of chlorophenols, chlorocatechols and chlorinated methoxyphenols in drinking water of the largest cities in Poland // *Pol. J. Environ. Stud.* – 2005. – Vol. 14. – P. 327-333.
25. Michałowicz J., Duda W. Phenols – Sources and Toxicity // *Polish J. Environ. Stud.* – 2007. – Vol. 16. – No. 3. – P. 347-362.
26. Poddubny A.G., Galat D.L. Habitat associations of upper Volga river fishes: effects of reservoirs // *Regulated rivers: research and management.* – 1995. – Vol. 11. – P. 67-84.

REFERENCES

1. Alabaster J., Lloyd R. *Kriterii kachstva vodi dlya presnovodnich rib* (Water Quality Criteria For Freshwater Fish). Moscow: Legkaya i pishchevaya promyshlennost' Publ., 1984. 344 p.
2. Anson M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 1938, 22: 79-83.
3. De Felice F.G., Ferreira S.T. Novel Neuroprotective, Neuritogenic and Anti-amyloidogenic properties of 2,4-dinitrophenol: The gentle face of janus. *IUBMB Life.* 2000, 58(4): 185-191.
4. Flerov B.A. *Ekologo-fiziologicheskie aspekty toksikologii presnovodnykh zivotnykh* (Ecological and physiological aspects of freshwater animals toxicology). St. Petersburg: Nauka Publ., 1989. 144 p.
5. Gerking S.D. *Feeding ecology of fish.* New York: Acad. Press, 1994, 416 p.
6. Ivanova M.N., Polovkova S.N., Kiyashko V.I., Bakanov A.I. In: *Teoreticheskie aspekty rybokhozyaistvennykh issledovaniy vodokhranilishch* (Ecological and physiological aspects of fishery's investigations of reservoirs, eds. N.V. Butorin, A.G. Poddubnyi). St. Petersburg: Nauka Publ., 1978, P. 55-77.
7. Kharlampovich G.D., Churkin Y. *Fenoli* (Phenols). Moscow: Chemistry Publ., 1974. 376 p.
8. Kuz'mina V.V. *Zhurnal obschei biologii - Journal of General Biology*, 1987, 48(6): 828-838.
9. Kuz'mina V.V. *Fiziologo-biokhimicheskie osnovy ekzotrofii ryb* (Physiological and biochemical principles of exotrophy processes in fish). Moscow: Nauka Publ., 2005, 300 p.
10. Kuz'mina V.V., Gracheva E.L., Tarleva A.F., Tazhimuratova U.Zh. In: *Antropogennoe vliyaniye na vodnye organizmy i ekosistemy. Mater. V Vseros. konf. po vodnoi ekotoksikologii* (Anthropogenic impact on aquatic organisms and ecosystems. Proc. V Russian. conf. on aquatic ecotoxicology). 2014. 2: 62-66.
11. Kuz'mina V.V., Ushakova N.V. The dependence on temperature and pH of the effects of zinc and copper on proteolytic activities of the digestive tract mucosa in piscivorous fish and their potential preys. *Fish Physiol. Biochem.* 2010, 36(3): 787-795.
12. Kuz'mina V.V., Ushakova N.V. Influence of temperature and pH on the effects of zinc and copper on proteolytic activities of the intestinal mucosa of planktivorous and benthophagous fishes and their potential preys. *Environ. Toxicol. Chemistry.* 2013, 95(1): 150-162.
13. Kuz'mina V. V., Skvortsova E.G., Zolotareva G.V., Sheptitskiy V.A. Influence of pH upon the activity of glycosidases and proteinases of intestinal mucosa, chyme and microbiota in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 2011, 37(3): 345-357.
14. Lewis S., Grimwood M., Comber S., Wroath A., Sutton A. *Proposed environmental quality standards for phenol in water.* Bristol: Environment Agency Rio House Waterside Drive Aztec West Almondsbury Publ., 1995, 100 p.
15. Luk'yanenko V.I. *Obshchaya ikhtiotoksikologiya* (Total toxicology of fishes). Moscow: Legkaya i pishchevaya promyshlennost' Publ., 1983. 320 p.

16. Michałowicz, J. The occurrence of chlorophenols, chlorocatechols and chlorinated methoxyphenols in drinking water of the largest cities in Poland. *Pol. J. Environ. Stud.* 2005, 14: 327-333.
17. Michałowicz J., Duda W. Phenols – Sources and Toxicity. *Polish J. Environ. Stud.* 2007, 16(3): 347-362.
18. Nemova N.N., Vysotskaya R.U. *Biokhimicheskaya indikatsiya sostoyaniya ryb* (Biochemical indication of fish state). Moscow: Nauka Publ., 2004, 210 p.
19. Nevalenyyi A.N., Tuktarov A.V., Bednyakov D.A. *Funktsional'naya organizatsiya i adaptivnaya regulyatsiya protsessov pishchevareniya u ryb* (Functional organization and adaptive regulation of digestive processes in fish). Astrakhan': Astrakhan State Technical University, 2003, 152 p.
20. Poddubny A.G., Galat D.L. Habitat associations of upper Volga river fishes: effects of reservoirs. *Regulated Rivers: Research and Management.* 1995, 11: 67-84.
21. Reshetnikov Y.S., Shatunovskii M.I. *Monitoring bioraznoobraziya* (Monitoring of biodiversity). Moscow: Nauka Publ., 1997, P. 26-32.
22. Romanenko V.I., Zakharova L.I., Romanenko V.A., Gavrilova V.A., Sokolova E.A. In: *Vliyanie stokov Cherepovetskogo promyshlennogo uzla na ekologicheskoe sostoyanie Rybinskogo vodokhranilishcha* (Influence of wastewater of Cherepovets industrial unit on the ecological state of the Rybinsk Reservoir). Moscow: VINITI Publ., 1990, P. 24-41.
23. Spitsyna T.P., Khokhlova A.I., Stepen' R.A. *Vestnik Krasnoyarskogo gosuniversiteta. Estestvennye nauki - Bulletin of Krasnoyarsk State Univer. Ser. Natural Sci.* 2006, 5: 120-126.
24. Stepanovskikh A. (eds.). *Obschaya Ekologiya* (General Ecology). Moscow: UNITY Publ, 2000, 510 p.
25. Sursyakova V.V., Bondareva L.G., Burmakina G.V., Rubailo A.I. *Dokladi akademii nauk - Reports of the Academy of Sciences.* 2011, 441(6): 667-770.
26. Ugolev A.M., Kuz'mina V.V. *Pishchevaritel'nye protsessy i adaptatsii u ryb* (Digestion processes and adaptations in fishes). St. Petersburg: Gidrometeoizdat Publ., 1993, 238 p.
27. Zaprometov M.N. *Osnovy biokhimii fenol'nykh soedinenii* (Foundation of Biochemistry of phenolic compounds). Moscow: Visshaya shkola Publ, 1974, 214 p.

Effect of phenol and its derivatives on the activity of peptidases of mucosa and chyme in fish

¹Kuzmina V.V., ² Gracheva E.L., ¹ Tarleva A.F.

¹*Papanin Institute for Biology of Inland Waters, 152742 Borok Yaroslavl oblast,*

²*Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl., Russian Federation*

ABSTRACT. Disposal of phenolic water in reservoirs causes a significant change in the regime of biogenic elements, level of oxygen and carbon dioxide; phenol also exerts a negative influence on aquatic organisms. The aim was to study *in vitro* the effects of phenol and its derivatives on the activity in digestive tract of trypsin- and chymotrypsin peptidases in different fish species. The subjects were bream *Abramis brama* (L.), white bream *Blicca bjoerkna* (L.), roach *Rutilus rutilus* (L.), river perch *Perca fluviatilis* L. from Rybinsk reservoir and pond carp *Carassius carassius* (L.). Caseolytic activity (predominantly trypsin activity) and hemoglobin-lytic activity (predominantly chymotrypsin activity) were evaluated in intestinal mucosa and chyme during incubation of homogenates in the presence of phenol and its derivatives (4-chlorophenol, 4-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol) at a concentration of 1 mM. Phenol and its derivatives induced a significant decrease in activity and casein- and hemoglobinlytic peptidases of the intestinal mucosa and chyme from different fish species. The degree of reduction of enzyme activity depends on the location and type of fish peptidases. Phenol and its derivatives caused a significant decrease in activity and casein- and hemoglobin-lytic peptidases of the intestinal mucosa and chyme in different fish species. The degree of decrease in enzyme activity depends on the localization of peptidases and on fish species.

Key words: fish, xenobiotics, phenol derivatives, digestion, peptidases

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2015, 3: 59-67

Поступило в редакцию: 01.04.2015

Получено после доработки: 13.05.2015

Кузьмина Виктория Вадимовна, д.б.н., проф., т. 8-920-149-25-21;

vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru;

Грачева Екатерина Леонидовна, ст. преп., т. 8(910) 977-37-59, 2 553 25 53;

6652553@mail.ru;

Тарлева Анастасия Федоровна асп., т. (373) 5574 23 36; (373) 6972 98 25, *кобка_85@mail.ru*