

УДК 574.64:577.1:151.03

Влияние цинка и меди на активность протеаз пищеварительного тракта, обеспечивающих неспецифическую защиту рыб

В.В. Кузьмина

Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН (ФГБУН «ИБВВ им. И.Д.Папанина», п. Борок)
E-mail: vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru

В условиях *in vitro* цинк и медь в концентрациях 0,1–50 мг/л достоверно снижают активность химотрипсиноподобных протеаз слизистой оболочки кишечника карпа *Cyprinus carpio* L. (максимум на 53,3 и 91,1%). Активность трипсиноподобных протеаз слизистой в тех же условиях снижается в большей степени (максимум на 71,5 и 95,2%). В условиях *in vivo* активность трипсиноподобных протеаз под действием цинка и меди (10–200 мг/л) снижается в меньшей степени (максимум на 40 и 48%), чем в опытах *in vitro*. Низкая концентрация цинка (10 мг/кг) в пище при однократном кормлении стимулирует активность трипсиноподобных протеаз химуса и слизистой, более высокие — ингибируют. Повторное кормление вызывает стимуляцию протеаз химуса при более высокой концентрации цинка (100 мг/кг). Медь во всех вариантах опыта снижает активность протеаз. При повторном введении металлов с кормом в большинстве случаев их эффект выражен слабее, чем при однократном введении. Наличие в воде и пище цинка и меди, ингибирующих активность протеолитических ферментов, снижает уровень неспецифической защиты рыб.

Ключевые слова: неспецифическая защита, карп *Cyprinus carpio*, химотрипсиноподобные протеазы, трипсиноподобные протеазы, кишечник, цинк, медь, *in vitro*, *in vivo*.

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что состояние иммунной системы в значительной мере зависит от эффективности питания рыб [Микряков, 1991], которая в свою очередь во многом зависит от состояния пищеварительной системы. При этом активность ферментов, обеспечивающих гидролиз различных компонентов пищи и делающих их доступными для поступления во внутреннюю среду организма, может значительно снижаться в результате стресса, вызываемого антропогенными факторами, в т. ч. тяжёлыми металлами. Важно отметить, что поступление в пищеварительный тракт некоторых компо-

нентов пищи, особенно белков, рассматривается как аллергическая и токсическая агрессия [Уголев и др., 1992]. Видовая специфичность чужеродных белков исчезает в результате их ферментативной деградации. При этом пищеварительные гидролазы, в частности протеазы, разрушающие белки, наряду со слизью и структурами желудочно-кишечного тракта выступают в роли неспецифического защитного барьера [Дое, 1989; Уголев и др., 1992; Кузьмина, 1995]. Наличие в пище токсических веществ, в т. ч. тяжёлых металлов, подавляет активность протеаз [Кузьмина, 2008], снижая надёжность неспецифической защиты.

Особо следует отметить, что тяжёлые металлы, поступающие в воду в результате антропогенного загрязнения среды, могут, включаясь в пищевые сети, представлять серьёзную опасность для рыб [Harrison, Klaverkamp, 1989; Harrison et al., 1990; Zauke et al., 1999; Остроумова, 2001; Немова, Высоцкая, 2004]. При этом цинк и медь, будучи жизненно необходимыми [Остроумова, 2001; Bury et al., 2003], в высоких концентрациях могут снижать активность протеаз [Неваленный и др., 2003; Кузьмина, 2008]. Влияние металлов на активность пищеварительных гидролаз, как правило, исследуется в условиях *in vitro*. Однако известно, что у рыб существуют механизмы детоксикации тяжёлых металлов [McCarter et al., 1982; Perkins et al., 1997; Paris-Palacios et al., 2000; Коновалов, 2001; Столяр и др., 2003]. Следовательно, при длительном воздействии тяжёлых металлов, попадающих в пищеварительный тракт рыб с пищей, их эффекты могут существенно отличаться от таковых в острых экспериментах.

Цель работы состояла в сопоставлении данных по влиянию цинка и меди на активность протеаз кишечника рыб в условиях *in vitro* и *in vivo* на примере карпа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Проведено две серии экспериментов. Объект исследования — молодь карпа *Cyprinus carpio* L., 1758, сем. карповые Cyprinidae, выращенная на прудовой базе ИБВВ РАН «Сунога». В первой серии опытов масса рыб соответствовала 40 ± 6 г. После доставки в лабораторию рыб в течение нескольких дней содержали в аквариумах с проточной водой для снятия транспортировочного стресса. опыты проводили при комнатной температуре. Рыб помещали на стекло ледяной бани. На холоде изымали пищеварительный тракт, освобождали от жира, осушали фильтровальной бумагой и разрезали вдоль и специальным скребком снимали слизистую оболочку кишечника. Слизистую от десяти особей объединяли в равных пропорциях и тщательно перемешивали. При помощи стеклянного гомогенизатора готовили гомогенаты, добавляя охлаждённый до $2-4$ °C раствор Рингера (109 мМ NaCl, 1,9 мМ KCl, 1,1 мМ CaCl₂) в соотношении 1:49, pH 7,4.

Для оценки влияния цинка и меди на активность протеаз в каждую пробирку приливали 0,25 мл раствора CuSO₄·5H₂O или ZnSO₄·7H₂O в широком диапазоне концентраций (0,1, 1, 10, 25 и 50 мг/л, в расчёте на содержание ионов металла) и 0,25 мл гомогената. В каждую пробирку, служащую контролем, при непрерывном перемешивании приливали 0,25 мл раствора Рингера и 0,25 мл гомогената. Затем содержимое всех пробирок инкубировали при температуре 20 ± 1 °C в течение 1 ч при непрерывном перемешивании. После этого приливали 0,5 мл субстрата и инкубировали ещё в течение 30 мин в тех же условиях для лучшего контакта фермента с субстратом. После этого во все пробирки приливали 1 мл ТХУ. Пробирки выдерживали при той же температуре в течение 1 ч. Пробы фильтровали через бумажные фильтры в течение 5–10 мин. Затем к 0,25 мл фильтрата приливали 0,25 мл CuSO₄, 2 мл NaOH и 0,75 мл реактива Фолина-Чиокальтеу. Пробирки с содержимым оставляли на 30 мин под тягой для развития окраски. Через 30 мин пробы просматривали на фотоэлектроколориметре КФК-2 (длина волны 670 нм). Для определения гемоглоблинлитической активности ферментов слизистой оболочки кишечника (преимущественно химотрипсин, КФ 3.4.21.1) использовали 1% раствор гемоглобина. Для определения казеинлитической активности слизистой оболочки кишечника (преимущественно трипсин, КФ 3.4.21.4) использовали 1% раствор казеина (pH 7,4). Активность ферментов определяли в 5-ти повторностях для каждой точки с учётом фона (количество соответствующих компонентов в исходном гомогенате). Для построения калибровочной кривой использовали 0,5–3,0 мМ растворы тирозина. Активность фермента выражали в единицах скорости ферментативной реакции (количество образовавшегося тирозина за 1 мин инкубации) в пересчёте на 1 г влажной массы ткани.

Во второй серии опытов использовали сеголетков карпа массой $9,2 \pm 0,4$ г. Рыбы, разделённые на 13 групп по пять экз. в каждой (контроль и 12 экспериментальных групп), получали корм, содержащий сернокислый цинк или сернокислую медь (CuSO₄·5H₂O или ZnSO₄·7H₂O) в концентрации 10, 50, 100

или 200 мг/кг. Рыб, получавших одну порцию корма (5% от массы тела), содержащего металлы, анализировали через 5 ч (группа I). Рыб другой группы кормили дважды с интервалом в 24 ч и анализировали через 5 ч после второго кормления (группа II). Кишечник рыб изымали в тех же условиях. После сагитального разреза кишки при помощи пластмассового скребка и небольшого (5 мм) стеклянного шпателя отбирали химус. Затем снимали слизистую оболочку. Химус или слизистую от 5 особей объединяли в равных пропорциях и тщательно перемешивали. Навески химуса и слизистой гомогенизировали в тех же условиях. Гомогенаты разводили раствором Рингера в соотношении 1:99. Активность протеаз (преимущественно трипсин КФ 3.4.21.4) определяли описанным выше способом в 5-ти повторностях с учётом фона. Данные обеих серий опытов обработаны статистически с использованием приложения EXCEL программы MS Office'XP. Достоверность результатов оценивали по F-критерию Фишера для малых выборок при уровне значимости $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Данные, касающиеся гемоглоблинитической активности слизистой оболочки кишечника карпа, свидетельствуют о последовательном

увеличении степени воздействия цинка и, особенно, меди на уровень ферментативной активности (табл. 1).

Важно отметить, что, начиная с дозы 0,1 мг/л, металлы достоверно снижают уровень ферментативной активности. Если в присутствии наименьшей концентрации цинка и меди (0,1 мг/л) уровень активности падает на 21,6 и 29%, то в присутствии наибольшей — на 53,3 и 91,1%. Сопоставление этих значений свидетельствует о том, что по мере увеличения концентрации металлов негативные эффекты меди усиливаются в большей степени, чем таковые цинка. Действительно, негативное воздействие меди в минимальной концентрации превышает таковое цинка лишь в 1,1 раза, в максимальной концентрации — в 1,7 раза.

Казеинлитическая активность протеаз слизистой оболочки кишечника карпа также подвержена значительному воздействию цинка и меди. При этом степень влияния металлов на уровень ферментативной активности выше по сравнению с гемоглоблинитической активностью. Так, в присутствии наименьшей концентрации цинка и меди уровень активности снижается на 25,8 и 30,7%, в присутствии максимальной концентрации — на 71,5 и 95,2%. При этом различия в степени негативного воздействия металлов также увеличиваются. Так, показатель торможения активно-

Таблица 1. Влияние цинка и меди на гемоглоблинитическую и казеинлитическую активность слизистой оболочки кишечника карпа, pH 7,4

Показатель	Активность протеаз в присутствии металлов*					
	0	0,1	1	10	25	50
<i>Гемоглоблинитическая активность</i>						
1	$\frac{4,17 \pm 0,11}{6,26 \pm 0,37}$	$\frac{3,27 \pm 0,29}{4,45 \pm 0,23}$	$\frac{3,06 \pm 0,11}{2,57 \pm 0,26}$	$\frac{2,43 \pm 0,17}{0,83 \pm 0,11}$	$\frac{2,15 \pm 0,07}{0,56 \pm 0,20}$	$\frac{1,95 \pm 0,11}{0,56 \pm 0,36}$
2	$\frac{100}{100}$	$\frac{78,4}{710}$	$\frac{73,3}{41,0}$	$\frac{41,7}{86,8}$	$\frac{51,5}{8,9}$	$\frac{53,3}{91,1}$
<i>Казеинлитическая активность</i>						
3	$\frac{4,59 \pm 0,14}{5,91 \pm 0,14}$	$\frac{3,41 \pm 0,07}{4,10 \pm 0,14}$	$\frac{3,54 \pm 0,07}{3,51 \pm 0,21}$	$\frac{2,78 \pm 0,52}{1,67 \pm 0,20}$	$\frac{1,74 \pm 0,17}{0,66 \pm 0,24}$	$\frac{1,31 \pm 0,21}{0,50 \pm 0,44}$
4	$\frac{100}{100}$	$\frac{74,2}{69,3}$	$\frac{77,1}{59,3}$	$\frac{39,5}{71,8}$	$\frac{46,8}{11,1}$	$\frac{71,5}{95,2}$

Примечания. * — концентрация металла, мг/л; над чертой — цинк, под чертой — медь. 1 и 3 — активность протеаз, мкмоль/г·мин; 2 и 4 — активность протеаз, % от контроля, принятого за 100. Жирным шрифтом выделены достоверные различия по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

сти протеаз в присутствии меди в минимальной концентрации превышает таковой цинка лишь в 2,8 раза, в максимальной концентрации — в 3,1 раза.

Данные, касающиеся влияния цинка и меди, поступающих с пищей, на активность казеинлитических протеаз химуса и слизи оболочки кишечника рыб также свидетельствуют о зависимости эффекта от концентрации металла (табл. 2).

При этом под влиянием ионов цинка активность протеаз снижается в меньшей степени,

чем под влиянием ионов меди. У рыб группы I, получавших пищу, содержащую металлы в концентрации 10 мг/кг, в случае цинка протеолитическая активность слизистой и химуса недостоверно повышается относительно контроля, в случае меди — достоверно снижается. Важно отметить, что при увеличении дозы металла от 100 до 200 мг/кг активность протеаз у рыб группы I достоверно не изменяется. У рыб группы II цинк в концентрации 10 мг/кг вызывает различные эффекты, причем активность протеаз химуса достоверно

Таблица 2. Влияние цинка и меди, поступающих с пищей, на протеолитическую активность слизистой химуса и оболочка кишечника, рН 7.4

Концентрация металлов в корме, мг/кг		Активность протеаз	
		Слизистая	Химус
Контроль	0	$\frac{3,09 \pm 0,11}{100}$	$\frac{3,01 \pm 0,08}{100}$
		<i>Цинк</i>	
Группа I	10	$\frac{3,27 \pm 0,27}{105,8(+5,8)}$	$\frac{3,21 \pm 0,06}{106,7(+6,7)}$
	100	$\frac{2,01 \pm 0,46^a}{65,1(-34,9)}$	$\frac{2,26 \pm 0,05^b}{75,1(-24,9)}$
	200	$\frac{2,03 \pm 0,38^a}{65,7(-34,3)}$	$\frac{2,10 \pm 0,06^b}{69,8(-30,2)}$
Группа II	10	$\frac{3,01 \pm 0,26}{97,4(-2,6)}$	$\frac{3,74 \pm 0,09^c}{124,3(+24,3)}$
	100	$\frac{2,84 \pm 0,24}{91,9(-8,1)}$	$\frac{3,29 \pm 0,08^a}{109,3(+9,3)}$
	200	$\frac{1,87 \pm 0,29^c}{60,5(-39,5)}$	$\frac{2,65 \pm 0,10^a}{88,4(-11,6)}$
		<i>Медь</i>	
Группа I	10	$\frac{2,26 \pm 0,08^c}{73,1(-26,9)}$	$\frac{2,37 \pm 0,05^c}{78,7(-19,3)}$
	50	$\frac{2,27 \pm 0,08^c}{73,5(-26,5)}$	$\frac{1,79 \pm 0,05^b}{59,5(-40,5)}$
	100	$\frac{2,19 \pm 0,07^c}{70,9(-29,1)}$	$\frac{1,57 \pm 0,06^b}{52,2(-47,8)}$
Группа II	10	$\frac{2,88 \pm 0,07^a}{93,2(-6,8)}$	$\frac{2,51 \pm 0,10^c}{83,4(-16,6)}$
	50	$\frac{2,68 \pm 0,07^a}{86,7(-13,3)}$	$\frac{2,30 \pm 0,08^c}{76,4(-23,6)}$
	100	$\frac{2,61 \pm 0,06^a}{84,5(-15,5)}$	$\frac{1,97 \pm 0,03^c}{65,5(-34,5)}$

Примечание. Над чертой активность протеаз, мкмоль/г·мин. «а» — различия достоверны $p < 0,05$, «б» — при $p < 0,01$, «в» — при $p < 0,001$. Под чертой активность протеаз, % от контроля, принятого за 100. В скобках указан процент модификации («-» — торможение, «+» — стимуляция).

увеличивается. Лишь максимальная концентрация цинка вызывает достоверное снижение уровня ферментативной активности, особенно в случае слизистой оболочки.

Под влиянием ионов меди активность протеаз слизистой оболочки у рыб группы I, как правило, снижается в меньшей степени по сравнению с таковой химуса. Степень снижения активности протеаз слизистой у рыб, получавших пищу, содержащую медь в концентрации 10 и 50 мг/кг, близка. Активность протеаз химуса последовательно снижается по мере увеличения концентрации металла. Увеличение концентрации меди на порядок (от 10 до 100 мг/кг) в случае слизистой не приводит к значительному увеличению эффекта, в случае химуса наблюдается усиление эффекта. У рыб группы II введение в корм меди не вызывает существенных изменений активности протеаз слизистой оболочки с увеличением концентрации металла. Активность протеаз химуса, напротив, последовательно уменьшается.

Сравнение результатов исследования рыб, получавших одну или две дозы цинка, позволило выявить существенные различия во влиянии на активности протеаз только в случае химуса: у рыб группы II наблюдается ослабление эффекта по сравнению с таковым у рыб из группы I. У рыб, получавших с пищей медь, наблюдается та же тенденция. Однако в данном случае эта закономерность распространяется и на ферменты слизистой.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Прежде, чем обсуждать полученные результаты, следует подчеркнуть, что цинк и медь поступают в организм рыб преимущественно с пищей [Harrison, Klaverkamp, 1989; Harrison et al., 1990; Verntssen et al., 1999; Handy et al., 2000; Остроумова, 2001; Kamunde et al., 2001; Вуру et al., 2003]. При этом для нормальной жизнедеятельности рыбам рекомендуется потреблять 15–40 мг цинка и 1–9 мг меди на килограмм сухого корма, а допустимые остаточные концентрации (ДОК) в мышцах рыб в случае цинка и меди равны 40 и 10 мг/кг сырой массы соответственно [Остроумова, 2001]. Вместе с тем залповые сбросы этих металлов, а также их смыв с поверхности земли дождевой и талой

водой, приводит к локальному увеличению их концентрации в воде. Так, в р. Волга концентрация цинка и меди может достигать 460 и 177 мг/л соответственно [Гапеева, 1993]. В условиях аквакультуры металлы могут поступать в пищеварительный тракт рыб с кормами, включающими продукты микробосинтеза. Так, в сухом продукте гаприна содержится до 300 мг/кг меди, в паприке — до 480 мг/кг цинка [Остроумова, 2001].

Данные, полученные в условиях *in vitro*, принципиально близки результатам исследования влияния цинка и меди на трипсиноподобные протеазы хрящевых ганойдов (белуги *Huso huso* и осетра *Acipenser güldenstädti*) [Неваленный и др., 2003]. Вместе с тем влияние ионов цинка в низкой концентрации (10 мг/л) на активность протеаз слизистой у карпа выражено сильнее, чем у таких осетровых рыб, как стерлядь *Acipenser ruthenus*, белуга *Huso huso*, бестер *Huso huso* × *Acipenser ruthenus* и стербел *Acipenser ruthenus* × *Huso huso* [Бедняков и др., 2011]. Значительное снижение активности протеаз в присутствии металлов может быть обусловлено их связыванием с регуляторными центрами, вызывающим изменение конформации ферментов.

В опытах *in vivo* активность трипсиноподобных протеаз снижалась в меньшей степени, чем в опытах *in vitro*. Так, в присутствии меди в концентрации 50 мг/л в условиях *in vivo* активность трипсиноподобных протеаз слизистой снижалась на 26,5, химуса — на 40,5%. В опытах *in vitro* при той же концентрации меди активность трипсиноподобных протеаз слизистой снижалась на 95,2%. Кроме того, в условиях *in vivo* выявлена меньшая зависимость эффекта металлов от их концентрации по сравнению с результатами опытов *in vitro*.

По всей вероятности, наблюдаемое явление связано с различиями в составе инкубационной и энтеральной сред, в которых происходит взаимодействие металлов и ферментов. И в том, и в другом случае ионы металлов могут связываться с аминокислотами и белками, однако лишь в условиях *in vivo* происходит элиминация металлов. По-видимому, именно с этим может быть связано некоторое увеличение уровня активности протеаз у рыб группы I в присутствии цинка. При этом поступающие

в пищеварительный тракт активные ионные формы металлов могут избирательно связываться с аминокислотами и белками, находящимися в энтеральной среде [Бауман, 1977; Glover, Hogstrand, 2002]. Особого внимания заслуживает тот факт, что гистидин, цистеин и таурин способствуют повышенной аккумуляции цинка в форме хелатирующего комплекса в зоне щеточной каймы энтероцитов, причём цистеин способствует абсорбции металла [Glover, Hogstrand, 2002]. Наблюдающаяся в большинстве случаев более высокая относительная активность протеаз у рыб группы II рыб по сравнению с таковой группы I в присутствии обоих металлов может свидетельствовать о стимуляции защитных сил организма.

При этом возможно увеличение концентрации металлотионеинов (низкомолекулярных термостабильных белков, отличающихся большим содержанием цистеина), участвующих в детоксикации и выведении металлов из организма [Роева и др., 1999; Dang et al., 1999; Muto et al., 1999; Коновалов, 2001]. У радужной форели *Salmo irideus* выявлены металлотионеины с молекулярной массой <3, 11, 30 и >70 кДа. При этом цинк, поступающий с пищей или водой, связывается преимущественно с низкомолекулярной фракцией (<3 кДа) [Spry, Wood, 1989].

Важно обратить внимание на то, что и в острых, и в хронических опытах активность протеаз под влиянием ионов цинка снижается в меньшей степени, чем под влиянием ионов меди. Это связано с тем, что индукцию синтеза металлотионеинов вызывает поступление в организм металлов, после чего их содержание в тканях возрастает, достигая максимума через несколько дней после начала контакта рыб с металлами [Роева и др., 1999]. При этом индуцирующая способность у цинка выше, чем у меди [Pourang et al., 2004]. Также важна концентрация металла. При введении в рацион молоди атлантического лосося *Salmo salar* меди в концентрации 5,35 и 700 мг Cu/кг сухого корма увеличение концентрации металлотионеинов в печени (в 3,5 и 89 раз) отмечено только для рыб, получавших два последних варианта корма [Berntssen et al., 1999]. Если количество металлов превышает связывающую способность белков, то они

аккумулируется глутатионом [Столяр и др., 2003; Bury et al., 2003]. Помимо этого, ионные формы металлов могут связываться слизью [Kamunde et al., 2001].

Вместе с тем анализ имеющихся данных затрудняет то обстоятельство, что высвобождение тяжёлых металлов, поступающих с пищей, и переход в активное состояние происходит постепенно в процессе переваривания рыбой пищи. При этом высвобождающиеся из пищи ионные формы металлов, как указывалось выше, могут снова связываться с аминокислотами и белками. Также осложняет оценку реального содержания тяжёлых металлов в полости кишечника разная скорость их рециклинга. В частности, после попадания цинка в пищеварительный тракт карпа его концентрация в химусе в течение 6 ч существенно снижается, в то время как концентрация меди через 3 ч снижается, а через 6 ч снова возрастает [Яржомбек и др., 1980]. Вместе с тем, независимо от условий экспериментов, ясно, что оба металла существенно снижая активность протеаз, негативно влияют на усвоение рыбами белковых компонентов пищи.

Выводы

1. В условиях *in vitro* цинк и медь в концентрациях 0,1–50 мг/л достоверно снижают активность химотрипсиноподобных протеаз слизистой оболочки кишечника карпа. В присутствии наименьшей концентрации цинка и меди уровень активности уменьшается на 21,6 и 29%, то в присутствии наибольшей — на 53,3 и 91,1%.

2. Активность трипсиноподобных протеаз слизистой оболочки кишечника карпа в тех же условиях снижается в большей степени. В присутствии наименьшей концентрации цинка и меди уровень активности уменьшается на 25,8 и 30,7%, то в присутствии наибольшей — на 71,5 и 95,2%.

3. В условиях *in vivo* активность трипсиноподобных протеаз под действием металлов снижается в меньшей степени, чем в опытах *in vitro*. Низкие концентрации цинка (10 мг/кг) при однократном введении стимулируют активность трипсиноподобных протеаз химуса и слизистой оболочки кишечника карпа, более высокие — ингибируют. При двукратном вве-

дении цинка стимуляция протеаз химуса наблюдается и при более высокой концентрации металла — 100 мг/кг. Медь во всех вариантах опыта снижает активность протеаз.

4. При повторном введении с кормом металлов в большинстве случаев их эффект выражен слабее, чем при однократном введении.

5. Наличие в воде и пище цинка и меди, ингибирующих активность протеолитических ферментов, снижает уровень неспецифической защиты рыб.

Автор выражает глубокую благодарность О.П. Лупилу и А.Ф. Тарлевой за техническую помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

- Бауман В.К. 1977. Всасывание двухвалентных ионов // Физиология всасывания. Гл. 4. Руководство по физиологии. (Ред. А.М.Уголев). Л.: Наука. С. 152–121.
- Бедняков Д.А., Неваленная Л.А., Новинский В.Ю. 2011. Влияние ионов металлов на ферменты мембранного пищеварения белуги, стерляди и их гибридов бестера и стербела // Вестник Астраханского государственного технического университета. № 2. С. 74–77.
- Гапеева М.В. 1993. Биогеохимическое распределение тяжёлых металлов в экосистеме Рыбинского водохранилища // Современное состояние экосистемы Рыбинского водохранилища. СПб: Гидрометиздат. С. 42–49.
- Коновалов Ю.Д. 2001. Реакция белоксинтезирующей системы рыб на наличие в их организме катионов ртути, кадмия, меди и цинка // Гидробиол. ж. Т. 37. № 1. С. 95–105.
- Кузьмина В.В. 1995. Защитная функция пищеварительного тракта рыб // Вопр. ихтиологии. Т. 35. № 1. С. 86–93.
- Кузьмина В.В. 2008. Физиология питания рыб. Влияние внешних и внутренних факторов. Борок: ИБВВ РАН. 276 с.
- Микряков В.Р. 1991. Закономерности формирования приобретённого иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН. 153 с.
- Неваленный А.Н., Туктаров А.В., Бедняков Д.А. 2003. Функциональная организация и адаптивная регуляция процессов пищеварения у рыб. Астрахань: АГТУ. 152 с.
- Остроумова И.Н. 2001. Биологические основы кормления рыб. СПб: Изд. ГосНИОРХ. С. 372.
- Роева Н.Н., Сидоров А.В., Юровицкий Ю.Г. 1999. Металлотioneины — белки, связывающие тяжёлые металлы у рыб // Известия РАН. сер. Биол. № 6. С. 748–755.
- Столяр О.Б., Курант В.Э., Хоменчук В.А., Грубинко В.В. 2003. Характеристика низкомолекулярных серосодержащих соединений гепатопанкреаса карпа при интоксикации медью и цинком // Гидробиол. журн. Т. 39. № 4. С. 91–98.
- Уголев А.М., Иезуитова Н.Н., Тимофеева Н.М. 1992. Энзиматический барьер тонкой кишки // Физиол. журн. Т. 78. № 8. С. 1–20.
- Яржомбек А.А., Щербина Т.В., Здор В.И., Бекена Е.Н. 1980. Влияние формы веществ в кишечнике карпа на скорость их усвоения // Биологические основы рационального кормления рыб. М: ВНИИ-ПРХ. Вып. 27. С. 128–137.
- Berntssen M.H. G., Hylland K., Wendelaar Bonga S.E., Maage A. 1999. Toxic levels of dietary copper in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr // Aquat. Toxicol. V. 46. N2. P. 87–99.
- Bury N.R., Walker P.A., Glover Ch. N. 2003. Nutritive metal uptake in teleost fish // J.Exp. Biol. 206. P. 11–23.
- Dang Z., Lock R.A.C., Flik G., Wendelaar B.S.E. 1999. Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water. // Amer. J. Physiol. V. 277. N1. Pt 2. P. R320-R331.
- Doe W.F. 1989. The intestinal immune system // Gut. V. 30. P. 1679–1685.
- Glover C.N., Hogstrand C. 2002. Amino acid modulation of *in vivo* intestinal zinc absorption in freshwater rainbow trout. J. Exp. Biol. V. 205. P. 151–158.
- Handy R.D., Musonda M.M., Phillips C., Falla S.J. 2000. Mechanisms of gastrointestinal copper absorption in the African walking catfish: copper dose-effects and a novel anion-dependent pathway in the intestine // J. Exp. Biol. V. 203. P. 2365–2377.
- Harrison S.E., Klaverkamp J.F. 1989. Uptake, elimination and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) and lake whitefish (*Coregonus clupeaformis* Mitchill) // Environ. Toxicol. Chem. V. 8. P. 87–97.
- Harrison S.E., Klaverkamp J.F., Hesslein R.H. 1990. Fates of metal radiotracers added to a whole lake: Accumulation in fathead minnow (*Pimephales promelas*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*) // Water Air Soil Pollut. V. 52. N3–4. P. 277–294.
- Katunde C.N., Grosell M., Lott J.N.A., Wood C.M. 2001. Copper metabolism and gut morphology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic sublethal dietary copper exposure. Can. J. Fish. Aquat. Sci. V. 58. P. 293–305.
- McCarter J.A., Matheson A.T., Roch M. et al. 1982. Chronic exposure of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to sublethal concentrations of copper: 2.

- Distribution of copper between high-molecular-weight and low-molecular-weight proteins in liver cytosol and the possible role of metallothionein in detoxification // *Compar. Biochem. Physiol.* V. 72. N1. P. 21–26.
- Muto N., Ren H-W., Hwang G-S. et al. 1999. Induction of two major isoforms of metallothionein in crucian carp (*Carassius cuvieri*) by air-pumping stress, dexamethasone, and metals // *Compar. Biochem. Physiol.* V. 122 C. N1. P. 75–82.
- Perkins E.J., Griffin B., Hobbs M. et al. 1997. Sexual differences in mortality and sublethal stress in channel catfish following a 10 week exposure to copper sulfate // *Aquat. Toxicol.* V. 37. N4. P. 327–339.
- Spry D.J., Wood C.M. 1989. The influence of dietary and waterborne zinc on heat-stable metal ligands in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: quantification by cadmium-109 radioassay and evaluation of the assay // *J. Fish Biol.* V. 35. N4. P. 557–576.
- Zauke G. — P., Savinov V.M., Ritterhoff J., Savinova T. 1999. Heavy metals in fish from the Barents Sea (summer 1994) // *Sci. Total Environ.* V. 227. 161–173.
- REFERENCES**
- Bauman V.K. 1977. Vsasyvanie dvuhvalentnykh ionov [Transport of divalent ions] // *Fiziologiya vsasyvaniya*. Gl 4. Rukovodstvo po fiziologii (Red. A.M. Ugolev) L.: Nauka. S. 152–121.
- Bednyakov D.A., Nevalennaya L.A., Novinskij V.Y. 2011. Vliyanie ionov metallov na fermenty membrannogo pishchevareniya belugi, sterlyadi i ih gibridov bestera i sterbela [Influence of metal ions on membrane digestion enzymes of beluga, sterlet and their hybrids — bester and sterbel] // *Vestnik Aastrahanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta* N2. S. 74–77.
- Gapeeva M.V. 1993. Biogeoхимическое распределение tyazhelykh metallov v ehkositeme Rybinskogo vodohranilishcha [Biogeochemical distribution of heavy metals in the ecosystem of the Rybinsk Reservoir] // *Sovremennoe sostoyanie ehkositemy Rybinskogo vodohranilishcha*. SPb: Gdrometioizdat. S. 42–49.
- Konovalov Y.D. 2001. Reakciya beloksinteziruyushchej sistemy ryb na nalichie v ih organizme kationov rtuti, kadmiya, medi i cinka [The reaction of protein-synthesizing system in fish in the presence of mercury cations, cadmium, copper and zinc in their body] // *Gidrobiol. Zh.* T. 37. N1. S. 95–105.
- Kuz'mina V.V. 1995. Zashchitnaya funkciya pishchevaritel'nogo trakta ryb [The protective function of the digestive tract of fish] // *Vopr. Ihtiologii*. T. 35. N1. S. 86–93.
- Kuz'mina V.V. 2008. Fiziologiya pitaniya ryb. Vliyanie vneshnih i vnutrennih faktorov. [The physiology of feeding in fish. The influence of external and internal factors]. Borok: IBVV RAN. 276 s.
- Mikryukov V.R. 1991. Zakonomernosti formirovaniya priobretnenogo immuniteta u ryb [Regularities of formation of acquired immunity in fishes]. Rybinsk: IBVV RAN. 153 s.
- Nevalenny A.N., Tuktarov A.V., Bednyakov D.A. 2003. Funkcionalnaya organizatsiya i adaptivnaya regulyatsiya processov pishchevareniya u ryb. [Functional organization and regulation of the adaptive processes of digestion in ryb] Astrahan: AGTU. 152 s.
- Ostromova I.N. 2001. Biologicheskie osnovy kormleniya ryb Biological basis of fish feeding [Biological basis of fish feeding]. SPb: Izd. GosNIORCh. 372 s.
- Roeva N.N., Sidorov A.V., Yurovitsky Y.G. 1999. Metallothioneiny — belki-svyazyvayushchie tyazhelye metally u ryb [Metallothioneins — proteins binding heavy metals in fish] // *Izvestiya Ran. Ser. Biol.* N6. S. 748–755.
- Stolyar O.B., Courant V.Z., Khomenchuk V.A., Grubinko V.V. 2003. Kharakteristika nizkomolekulyarnykh serosoderzhashchih soedinenij gepatopankreasa karpa pri intoksikatsii medyu i cinkom [Characteristics of low molecular weight sulfur compounds in carp hepatopancreas under intoxication of copper and zinc] // *Gidrobiol. Zhurn.* T. 39. N4. S. 91–98.
- Ugolev A.M., Iezuitova N.N., Timofeeva N.M. 1992. Ehnzimaticheskij barer tonkoj kishki [Enzymatic barrier of the small intestine] // *Fiziol. Zhurn.* T. V. 78. N8. S. 1–20.
- Yarzhombek A.A., Shcherbina T.V., Zdor V.I., Bekina E.N. 1980. Vliyanie formy veshchestv v kishechnike karpa na skorost ich usvoeniya [Effect of the substance structure on the rate of their transport in the intestine of carp] // *Biologicheskie osnovy racionalnogo kormleniya ryb*. M: Publ. VNIIPRKh. Vyp. 27. S. 128–137.

Поступила в редакцию 04.03.16 г.
Принята после рецензии 14.07.16 г.

Effect of zinc and copper on the gut protease activity providing non-specific protection of fish

V.V. Кузьмина

I.D. Papanin' Institute for Biology of Inland Waters RAS, Borok

In vitro zinc and copper (0.1–50 mg/L) significantly reduces the activity of intestinal mucosa chymotrypsin-like proteases in carp *Cyprinus carpio* L. (a maximum of 53.3 and 91.1%). The trypsin-like protease activity of intestinal mucosa under the same conditions is reduced to a greater extent (a maximum of 71.5 and 95.2%). Under *in vivo* conditions metals (10–200 mg/kg) decrease the activity of trypsin-like proteases to a lesser extent (a maximum of 40 and 48%) than those *in vitro* experiments. After single food consumption the low concentration of zinc (10 mg/kg) stimulates the activity of trypsin-like proteases of chyme and mucosa, the higher concentrations of metals — inhibited. Repeated consumption of zinc causes the stimulation of chyme proteases at higher concentrations of metal (100 mg/kg) also. Copper in all experimental variants reduces protease activity. After repeated consumption of food with metal in most cases their effects are less pronounced than after a single consumption. The presence in water and food of zinc and copper inhibiting activity of proteolytic enzymes, reduces the level of nonspecific protection of fish.

Key words: non-specific protection, carp *Cyprinus carpio*, chymotrypsin-like proteases, trypsin-like proteases, zinc, copper, *in vitro*, *in vivo*