

Г. А. Пенькова, А. А. Филиппов, И. Л. Голованова, Е. С. Степина

Влияние накопленной ртути на активность кишечных гликозидаз у рыжей полевки из различных биотопов

Установлено большее накопление ртути в тканях и химусе кишечника рыжих полевок из более влажных биотопов Воронежского заповедника. Накопление ртути сопровождалось разнонаправленными изменениями амилолитической активности, активности сахаразы и мальтазы. Активность ферментов химуса с ростом содержания ртути изменялась в большей степени по сравнению с кишечными ферментами.

Ключевые слова: рыжая полевка, пищеварение, гликозидазы, амилолитическая активность, сахараза, мальтаза, ртуть.

G. A. Penkova, A. A. Philippov, I. L. Golovanova, E. S. Stepina

Influence of the Saved Up Mercury on Intestinal Glycosidas' Activity in a Red-Backed Mouse from Various Biotopes

The maximal mercury accumulation in the intestinal wall and chyme in a red-backed mouse from more wet biotopes of Voronezh reserve was established. Increased mercury content in the intestine was accompanied with the alternate changes of the amylolytic activity, as well as the activity of sucrase and maltase. The activity of the chime enzymes with increase in mercury intestinal content changed in the more degree in comparison with intestinal enzymes.

Keywords: a red-backed mouse, digestion, glycosidase, an amylolytic activity, sucrase, maltase, mercury.

Ртуть занимает одно из ведущих мест среди тяжелых металлов, оказывающих токсическое воздействие на живые организмы. Она принадлежит к числу тиоловых ядов, блокирующих сульфгидрильные группы белков, входящих в состав важнейших для организма ферментов. Ртуть также реагирует с $-COOH$ и $-NH_2$ группами белков с образованием прочных комплексов – металлопротеинов. Нарушение нормальной работы белков-ферментов приводит к глубоким нарушениям в организме, и прежде всего, в центральной нервной системе и в почках.

Продолжительность жизни ртути в атмосфере невелика (несколько дней), однако в почве и воде она составляет сотни тысяч лет [9]. Наиболее токсичны органические соединения ртути, в состав которых входит метиловая группа. Поступая в организм с водой и пищей, метилртуть мигрирует по пищевым цепям как в водной, так и в наземно-воздушной среде, вызывая специфические отравления и заболевания у человека и животных. В то же время показано, что в малых количествах ртуть увеличивает иммунологическую устойчивость организма [10], а также повышает линейно-массовые размеры у рыб [1, 3].

Установлено, что ртуть вызывает значительные изменения белкового, липидного и углеводного обменов у позвоночных [3, 7]. Соединения ртути влияют на активность всех мембранных ферментов, в том числе и митохондриальных, участвующих в процессах энергопродукции [7]. При действии ртути у млекопитающих выявлены изменения активности антиоксидантных ферментов в печени и почках [12], а также изменения активности аргиназы и митоген-активируемой протеинкиназы [13, 14]. Накопление ртути, поступающей с пищей, вызывает разнонаправленные изменения активности и кинетических характеристик пищеварительных гликозидаз рыб [2, 4, 6].

Поскольку углеводы играют важную роль в энергетическом и пластическом обмене, для оценки физиолого-биохимического состояния в условиях антропогенного загрязнения особую актуальность представляет изучение влияния ртути на гидролиз углеводов в кишечнике животных. В то же время действие накопленной в организме ртути на пищеварительные ферменты млекопитающих из природных популяций изучено крайне слабо [8]. Рыжая полевка – мелкий мышевидный грызун – характеризуется высокой

численностью, коротким жизненным циклом (до 750 дней) и высокой скоростью метаболизма. Она является удобным объектом для изучения влияния ртути на переваривание углеводов, поскольку в ее рационе преобладают семена различных трав и деревьев, лесные ягоды, зелёные части растений.

В связи с этим цель работы состояла в изучении влияния накопленной в кишечнике ртути на активность гликозидаз в тканях и содержимом кишечника рыжей полевки *Myodes glareolus* Schreber из различных биотопов Воронежского заповедника.

Материалы и методы

Рыжие полевки средней массой 16–22 г отловлены осенью 2009 г. на разных биотопах (ольшаник, дубрава, осинник) Воронежского Биосферного заповедника. Ольшаник – наиболее влажный участок, затопляемый в половодье р. Усмань, дубрава – обширный участок склона (угол наклона ≤ 4 градусов) к руслу реки, осинник расположен выше дубравы по склону.

Полевок отлавливали с помощью давилок Геро на стандартную приманку – хлеб, обжаренный в подсолнечном масле. На каждом биотопе выставляли по 50 давилок (на 10 дней) на расстоянии 5 м друг от друга. После поимки зверьков взвешивали и проводили биологический анализ. Кишечники изымали и хранили при температуре -18°C не более двух недель. Всего в работе использовано 40 особей, разделенных на группы по половой принадлежности и содержанию ртути в стенке кишечника.

В лабораторных условиях кишечник очищали от жира и прилегающих тканей, отделяли медиальную часть кишечника и разрезали ее вдоль. При помощи пластмассового скребка удаляли химус, а слизистую оболочку кишечника промывали охлажденным до $2-4^{\circ}\text{C}$ раствором Рингера для теплокровных животных (152 ммоль NaCl, 5,7 ммоль KCl, 26 ммоль CaCl_2 , 1,8 ммоль NaHCO_3 , pH 7,4) для удаления остатков химуса. Кишечную стенку, наряду с химусом, использовали для приготовления исходного гомогената. Пробы ферментативно-активных препаратов готовили при помощи стеклянного гомогенизатора, добавляя охлажденный до $2-4^{\circ}\text{C}$ раствор. Растворы субстратов (1,8 % крахмала и 50 ммоль сахаразы) готовили на таком же растворе Рингера. Гомогенаты и растворы субстратов инкубировали при постоянном перемешивании в течение 30 или 60 мин при температуре 20°C , pH 7,4.

В стенке и химусе кишечника определяли *in vitro* активность гликозидаз: мальтазы КФ 3.2.1.20 (глюкозооксидазный метод), сахаразы КФ 3.2.1.48 (метод Нельсона), а также амилолитическую активность, отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал: α -амилазы, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы КФ 3.2.1.20 (метод Нельсона) [11]. Для определения активности мальтазы применяли набор для клинической биохимии «Фотоглюкоза» (ООО «Импакт», Россия). Ферментативную активность определяли в пяти повторностях и выражали в микромолях продуктов реакции, образующихся за 1 мин инкубации ферментативно-активного препарата и субстрата в расчете на 1 г влажной массы ткани (мкмоль/г·мин). Определение ртути проводили атомно-абсорбционным методом с использованием анализатора ртути РА-915. Результаты представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm m$). Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA, LSD-тест) при $p = 0,05$.

Результаты и обсуждение

Наибольшее накопление ртути в стенке кишечника и химусе рыжей полевки из дубравы и ольшаника существенно превышало аналогичные показатели у грызунов из более сухого биотопа осинник (табл. 1, 2). У отдельных самцов из дубравы содержание ртути достигало 60 мкг/кг сырой массы кишки и 126 мкг/кг сырой массы химуса. Содержание ртути в почвах исследованных биотопов снижалось в ряду ольшаник > дубрава > осинник [5] и положительно коррелировало с накоплением ртути в кишечнике ($r = 0,77$) и химусе ($r = 0,60$) самок. Наибольшие различия в уровне накопления ртути также отмечены у особей более влажных биотопов: содержание ртути в кишечнике различалось в 43 раза, в химусе – в 84 раза, в то время как у особей из осинника – лишь в 3 и 18 раз соответственно.

Уровень активности гликозидаз в тканях и химусе кишечника полевок достаточно высок, что хорошо согласуется с высоким содержанием углеводов в пище этих животных. Сравнение ферментативной активности у самцов и самок с близким содержанием ртути в кишечнике внутри одного биотопа позволило выявить половые различия (табл. 1). Так, при меньшем уровне накопления ртути у самок из осинника амилолитическая активность и активность мальтазы выше на 38 и 29 %, активность сахаразы, напротив, ниже на 33 %, чем у самцов. У самок из ольшаника

амилолитическая активность на 19 % ниже по сравнению с самцами, активность мальтазы и сахаразы примерно равна. Амилолитическая активность в химусе самок из осинника и ольшаника на 40 и 23 % ниже, чем у самцов, изменения активности других гликозидаз менее выражены (табл. 2). При более высоком уровне накопления ртути активность исследованных ферментов в стенке кишки и химусе у самок в большинстве случаев ниже, чем у самцов.

При анализе влияния накопленной ртути на активность гликозидаз у полевок с разных биотопов показаны разнонаправленные изменения амилолитической активности (табл. 1). У самцов

по мере накопления ртути отмечено как увеличение (на 10–87 %, ольшаник, осинник), так и снижение (на 20 %, дубрава) ферментативной активности. У самок достоверное увеличение амилолитической активности на 41 % отмечено лишь в дубраве. Активность сахаразы в большинстве случаев снижается (на 16–48 %), лишь у самцов из ольшаника отмечено увеличение ферментативной активности на 40 %. Статистически достоверные изменения активности мальтазы с увеличением содержания ртути в кишечнике отмечены лишь у полёвок из ольшаника: у самцов она увеличивается на 11 %, а у самок снижается на 13 %.

Таблица 1

Влияние накопленной ртути на активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника рыжей полевки из различных биотопов

Биотоп	Пол	n, экз.	Hg, мкг/кг сырой массы кишечника	Ферментативная активность, ммоль/г·мин		
				Амилолитическая	Сахараза	Мальтаза
Ольшаник	♂	$\frac{7}{3}$	$\frac{5,4 \pm 0,7}{25,7 \pm 1,8}$ ***	$\frac{28,00 \pm 0,62}{30,67 \pm 0,85}$ *	$\frac{3,89 \pm 0,09}{5,44 \pm 0,25}$ ***	$\frac{8,08 \pm 0,17}{9,00 \pm 0,10}$ **
	♀	$\frac{3}{4}$	$\frac{4,2 \pm 1,5}{24,3 \pm 5,0}$ **	$\frac{22,67 \pm 0,30}{21,60 \pm 1,03}$	$\frac{4,27 \pm 0,13}{3,60 \pm 0,18}$ *	$\frac{8,67 \pm 0,16}{7,58 \pm 0,08}$ ***
Дубрава	♂	$\frac{2}{4}$	$\frac{5,5 \pm 0,8}{35,3 \pm 9,5}$ *	$\frac{24,07 \pm 0,67}{19,27 \pm 0,54}$ **	$\frac{3,57 \pm 0,15}{2,53 \pm 0,06}$ ***	$\frac{7,92 \pm 0,29}{7,92 \pm 0,26}$
	♀	$\frac{2}{3}$	$\frac{12,0 \pm 0,0}{19,7 \pm 1,8}$ *	$\frac{15,40 \pm 0,64}{21,73 \pm 0,58}$ ***	$\frac{2,96 \pm 0,08}{2,88 \pm 0,14}$	$\frac{7,75 \pm 0,10}{7,58 \pm 0,44}$
Осинник	♂	$\frac{3}{3}$	$\frac{3,4 \pm 0,0}{8,3 \pm 0,4}$ ***	$\frac{15,11 \pm 0,12}{28,33 \pm 0,91}$ ***	$\frac{9,20 \pm 1,18}{4,77 \pm 0,07}$ **	$\frac{5,96 \pm 0,13}{6,38 \pm 0,13}$
	♀	$\frac{3}{3}$	$\frac{3,8 \pm 0,4}{6,8 \pm 1,6}$	$\frac{20,89 \pm 0,49}{20,40 \pm 0,95}$	$\frac{6,20 \pm 0,03}{4,43 \pm 0,01}$ ***	$\frac{8,09 \pm 0,13}{8,26 \pm 0,10}$

Примечание. Здесь и в табл. 2. В числителе группа с меньшим содержанием ртути, в знаменателе – с большим содержанием ртути; различия показателей у особей с разным содержанием ртути внутри одного биотопа статистически достоверны: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$; n – количество исследованных особей, экз.

Сравнительный анализ активности гликозидаз у полевок одного биотопа при низком содержании ртути показал, что амилолитическая активность в химусе у самок ниже, чем у самцов на 22–40 % (табл. 2). Различия в активности сахаразы и мальтазы носят разнонаправленный характер.

С ростом накопления ртути в химусе рыжей полевки отмечены разнонаправленные изменения активности всех изученных ферментов. Максимальное увеличение амилолитической активности на 97–99 % отмечено у особей обоего пола из ольшаника.

Таблица 2

Влияние накопленной ртути на активность гликозидаз химуса рыжей полевки из различных биотопов в осенний период

Биотоп	Пол	n, экз.	Hg, мкг/кг сырой массы химуса	Ферментативная активность, ммоль/г·мин		
				Амилолитическая	Сахараза	Мальтаза
Ольшаник	♂	$\frac{7}{7}$	$\frac{5,7 \pm 1,0}{5,7 \pm 1,0}$	$\frac{9,33 \pm 0,35}{9,33 \pm 0,35}$	$\frac{1,68 \pm 0,06}{1,68 \pm 0,06}$	$\frac{6,04 \pm 0,16}{6,04 \pm 0,16}$

		3	43,7 ± 6,2 ***	18,40 ± 0,34 ***	2,01 ± 0,11 *	8,94 ± 0,23 ***
	♀	$\frac{3}{4}$	$\frac{5,3 \pm 1,9}{27,0 \pm 2,5}$ ***	$\frac{7,20 \pm 0,31}{14,33 \pm 0,26}$ ***	$\frac{1,44 \pm 0,04}{1,60 \pm 0,03}$	$\frac{7,23 \pm 0,33}{7,74 \pm 0,09}$
Дубрава	♂	$\frac{2}{4}$	$\frac{17,3 \pm 11,8}{58,5 \pm 22,9}$	$\frac{10,53 \pm 0,83}{6,80 \pm 0,56}$ **	$\frac{1,30 \pm 0,08}{0,64 \pm 0,03}$ ***	$\frac{8,09 \pm 0,13}{6,38 \pm 0,00}$ ***
	♀	$\frac{2}{3}$	$\frac{14,0 \pm 0,0}{16,1 \pm 11,5}$	$\frac{6,73 \pm 0,12}{6,67 \pm 0,18}$	$\frac{1,55 \pm 0,04}{1,28 \pm 0,06}$ **	$\frac{6,64 \pm 0,10}{6,72 \pm 0,09}$
Осинник	♂	$\frac{3}{3}$	$\frac{4,0 \pm 0,0}{7,3 \pm 0,5}$ ***	$\frac{13,93 \pm 0,40}{10,33 \pm 0,32}$ ***	$\frac{0,91 \pm 0,01}{2,25 \pm 0,33}$ **	$\frac{6,81 \pm 0,10}{6,11 \pm 0,11}$ **
	♀	$\frac{3}{3}$	$\frac{7,1 \pm 2,2}{11,4 \pm 6,3}$	$\frac{8,33 \pm 0,15}{11,87 \pm 0,23}$ ***	$\frac{1,07 \pm 0,03}{1,52 \pm 0,06}$ ***	$\frac{5,89 \pm 0,13}{7,73 \pm 0,44}$ **

Активность сахаразы у полевок из биотопов ольшаник и осинник увеличивается на 11–148 %, а у животных из дубравы снижается на 17–51 %. Максимальное увеличение активности мальтазы на 48 % отмечено у самцов из ольшаника, а максимальное снижение на 21 % – у самцов из дубравы.

В большинстве случаев активность ферментов химуса, отражающая не только активность панкреатических ферментов консумента, но и активность тканевых ферментов жертвы и энтеральной микробиоты, с ростом содержания ртути изменялась в большей степени по сравнению с ферментами кишечной стенки (преимущественно слизистой оболочки). Эти результаты хорошо совпадают с данными, полученными ранее при исследовании бурозубки обыкновенной *Sorex araneus* [8]. Различия в величине и направленности эффектов могут быть обусловлены как большей адаптационной пластичностью панкреатической α-амилазы по сравнению с собственно кишечными ферментами, так и различиями характеристик ферментов, функционирующих в составе слизистой и химуса.

Ранее было показано, что накопление ртути в кишечнике бурозубок из тех же биотопов Воронежского заповедника и различных биотопов Череповецкого района Вологодской обл. на порядок выше, чем у рыжей полевки [5, 8]. У бурозубок из более влажных биотопов, почвы которых содержали большее количество металла, накопление ртути в органах и тканях выше, чем у животных из относительно сухих биотопов [5]. Несмотря на то, что у рыжей полевки из различных биотопов Воронежского заповедника показано большее накопление ртути в тканях и химусе кишечника особей, обитающих в более влажных условиях, в отличие от бурозубок, оно не

зависит от концентрации металла в почве. Активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника бурозубок, как правило, снижалась лишь при самых высоких концентрациях ртути, негативно влияя на скорость гидролиза углеводных компонентов пищи. Незначительное повышение содержания ртути приводило к достоверному повышению активности гликозидаз [8].

Уровень амилалитической активности и активности сахаразы в кишечнике рыжей полевки на порядок выше, чем у насекомоядной бурозубки, что хорошо согласуется с меньшим содержанием углеводов в пище последней. Именно этим можно объяснить отсутствие четкой зависимости активности гликозидаз от содержания ртути в тканях кишки рыжей полевки. Свидетельством в пользу данного предположения служит достоверное снижение активности гликозидаз с ростом содержания ртути у самцов из дубравы и самок из ольшаника, для которых характерны большие различия (в 5,8–6,4 раза) в накоплении металла в тканях кишечника.

Таким образом, при изучении рыжей полевки из различных биотопов Воронежского заповедника (ольшаник, дубрава, осинник) показано большее накопление ртути в тканях и химусе кишечника особей, обитающих в более влажных условиях. В большинстве случаев активность гликозидаз у самок ниже, чем у самцов. Накопление ртути сопровождалось разнонаправленными изменениями активности гликозидаз, гидролизующих углеводные компоненты пищи. Достоверное снижение активности гликозидаз, свидетельствующее о снижении скорости начальных этапов усвоения углеводов, отмечено при наибольшем содержании ртути в кишечнике. Активность ферментов химуса, отражающая не только

активность панкреатических ферментов консу-
мента, но и активность тканевых ферментов
жертвы и энтеральной микробиоты, с ростом со-

держания ртути изменялась в большей степени
по сравнению с кишечными ферментами.

Библиографический список

1. Глубоков, А. П. Рост трех видов рыб в ранние периоды онтогенеза в норме и в условиях токсического воздействия [Текст] / А. П. Глубоков // Вопр. ихтиологии. – 1990. – Т. 39, № 1. – С. 137–143.
2. Голованова, И. Л. Влияние ртути на гидролиз углеводов в кишечнике речного окуня *Perca fluviatilis* [Текст] / И. Л. Голованова, В. Т. Комов // Вопр. ихтиологии. – 2005. – Т. 45, № 5. – С. 695–701.
3. Голованова, И. Л. Влияние тяжелых металлов на физиолого-биохимический статус рыб и водных беспозвоночных [Текст] / И. Л. Голованова // Биология внутр. вод. – 2008. – № 1. – С. 99–108.
4. Голованова, И. Л. Гидролиз углеводов в кишечнике плотвы *Rutilus rutilus* (L.) при различном накоплении ртути в организме [Текст] / И. Л. Голованова, В. Т. Комов, В. А. Гремячих // Биология внутр. вод. – 2008. – № 3. – С. 102–108.
5. Комов, В. Т. Содержание ртути в почвах и в мелких млекопитающих различных биотопов воронежского заповедника [Текст] / В. Т. Комов, В. А. Гремячих, С. Ф. Сапельников, Ю. Г. Удоденко // Ртуть в биосфере : эколого-геохимические аспекты. Матер. Межд. симп. Москва, 7–9 сент. 2010. – М. : ГЕОХИ РАН, 2010. – С. 281–286.
6. Кузьмина, В. В. Влияние повышенного содержания ртути в корме рыб на процессы экзотрофии у карпа [Текст] / В. В. Кузьмина, В. Т. Комов, В. А. Гремячих, П. В. Русанова, А. В. Гладков // Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы. Матер. IV Всерос. конф. по водной экотоксикологии, посвящ. памяти Б. А. Флерова. – Борок, 2011. Ч. 1. – С. 146–150.
7. Немова, Н. Н. Биохимические эффекты накопления ртути у рыб [Текст] / Н. Н. Немова. – М. : Наука, 2005. – 164 с.
8. Пенькова, Г. А. Влияние накопленной ртути на гидролиз углеводов в кишечнике бурозубок различных экологических групп [Текст] / Г. А. Пенькова, Е. С. Степина, А. А. Филиппов, И. Л. Голованова, Н. Я. Поддубная // Ртуть в биосфере : эколого-геохимические аспекты. Матер. Межд. симп. – М. : ГЕОХИ РАН, 2010. – С. 309–314.
9. Скрипниченко, И. И. Биоценологические исследования ртути в ландшафтах Русской равнины [Текст] / И. И. Скрипниченко, Б. Н. Золотарева // Почвенно-биоценологические исследования центра Русской равнины. – Пушкино : ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1981. – С. 82–103.
10. Соколов, О. А. Атлас распределения тяжелых металлов в объектах окружающей среды [Текст] / О. А. Соколов, В. А. Черников, С. В. Лукин. – Белгород : Константа, 2008. – 188 с.
11. Уголев, А. М. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз [Текст] / А. М. Уголев, Н. Н. Иезуитова // Исследование пищеварительного аппарата у человека. – Л. : Наука, 1969. – С. 192–196.
12. Filipak Neto F.: Toxic effects of DDT and methyl mercury on the hepatocytes from *Hoplias malabaricus* [Text] / Neto F. Filipak, S.M. Zanata, H.C. Silva de Assis, L.S. Nakao, Randi M.A.F., C.A. Oliveira Ribeiro // Toxicol. in Vitro. 2008. 22. № 7. – P. 1705–1713.
13. Kanada Hironori: Downregulation of arginase II and renal apoptosis by inorganic mercury: Overexpression of arginase II reduces its apoptosis [Text] / Kanada Hironori, Kikushima Makoto, Homma-Takeda Shino, Sumi Daigo, Endo Akiko, Toyama Takashi, Miura Nobuhiko, Naganuma Akira, Kumagai Yoshito // Arch. Toxicol. 2008. 82, № 2. – P. 67–73.
14. Kim Sang Hyun: Mercury induces multidrug resistance-associated protein gene through p38 mitogen-activated protein kinase [Text] / Kim Sang Hyun, Bark Hyun, Choi Cheol Hee // Toxicol. Lett. 2005. 155. № 1. – P. 143–150.