

ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛА НА АКТИВНОСТЬ И ТЕМПЕРАТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЕПТИДАЗ ЛИЧИНОК ХИРОНОМИД ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗНАЧЕНИЯХ pH

© 2021 г. В. В. Кузьмина^а, *, Е. Ю. Чорная^б, В. А. Шептицкий^б

^аИнститут биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук, пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, Россия

^бПриднестровский государственный университет им. Т.Г. Шевченко, Тирасполь, Молдова

*e-mail: vkuzmina@ibiw.ru

Поступила в редакцию 27.11.2019 г.

После доработки 26.03.2020 г.

Принята к публикации 06.10.2020 г.

Исследовано влияние фенола (0.5 ммоль/л) на активность и температурную зависимость казеин- и гемоглобинлитических пептидаз, функционирующих во всем организме личинок хирономид *Chironomus* sp. в интервале температур 0–70°C при различных значениях pH (3.0, 5.0 и 7.4). Температурный оптимум исследованных пептидаз тканей личинок хирономид соответствует 40°C. В присутствии Ф активность казеинлитических пептидаз увеличивается, наиболее значительно при 20°C и pH 5.0 (в 3.3 раза), активность гемоглобинлитических пептидаз – при pH 3.0 (в 3.5 раза). Эффект при обеих температурах последовательно снижается от pH 3.0 до pH 7.4. В присутствии фенола форма кривых температурной зависимости и величина температурного коэффициента Q_{10} наиболее заметно изменяется в зоне высоких температур. Значения энергии активации пептидаз, гидролизующих казеин и гемоглобин, в зоне низких и высоких температур различны. В присутствии фенола значения энергии активации казеинлитических пептидаз при pH 7.4 увеличиваются, при pH 5.0 – уменьшаются в зоне высоких температур, гемоглобинлитических пептидаз – в большинстве случаев уменьшаются. Обсуждаются механизмы влияния фенола на активность пептидаз и процессы пищеварения рыб-бентофагов, потребляющих личинок хирономид.

Ключевые слова: личинки хирономид, фенол, пептидазы, температурная зависимость, pH

DOI: 10.31857/S0320965221020108

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что личинки хирономид, будучи объектами питания различных гидробионтов, играют важную роль в функционировании трофических сетей в водных экосистемах (Гусаков, 2007; Zelli et al., 2008; Рыбы..., 2015). При этом лишь на первой стадии развития они входят в состав зоопланктона, на трех последующих стадиях развития – в состав детрита (Pinder, 1986; Гусаков, 2007; Wardiatno, Krisanti, 2013). При этом наиболее важную роль личинки хирономид играют в питании рыб-бентофагов, многие из которых не имеют желудка (Иванова и др., 1978; Wardiatno, Krisanti, 2013; Рыбы..., 2015). Следовательно, у большей части рыб-бентофагов процессы пищеварения происходят в кишечнике при участии ферментов, синтезируемых поджелудочной железой и энтероцитами, осуществляющими

полостное и мембранное пищеварение (Уголев, Кузьмина, 1993).

Вместе с тем в процессах деградации объектов питания значительную роль может играть и механизм индуцированного аутолиза (Уголев, 1985). В реализации индуцированного аутолиза участвуют две группы внутриклеточных ферментов (цитозольные и лизосомальные) различных тканей. Наиболее важны лизосомальные ферменты, способные разрушать почти все биополимеры тканей животных (Высоцкая, Немова, 2008). Оптимум pH большинства лизосомальных ферментов, как правило, лежит в пределах 3.0–6.0, реже – при нейтральных значениях pH (Высоцкая, Немова, 2008). Вскоре после описания индуцированного аутолиза была доказана возможность его участия в пищеварении рыб (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2000). Наиболее важную роль механизм индуцированного аутолиза играет в процессах пищеварения, происходящих при низких значениях pH в желудке рыб (Кузьмина, 2000). Роль

Сокращения: Ф – фенол; $E_{\text{акт}}$ – энергия активации.

этого механизма в процессах аутодеградации объектов питания у безжелудочных рыб подробно не исследована, однако и у них может осуществляться индуцированный аутолиз при нейтральных и низких значениях рН. Действительно, в результате перетирания жертвы глоточными зубами, а также снижении концентрации кислорода в организме жертвы при ее попадании в верхние отделы кишечника в тканях усиливаются процессы гликолиза, вызывающие закисление интрацеллюлярной среды (Кузьмина, 2018). И первое, и второе создает условия для высвобождения ферментов из лизосом и реализации индуцированного аутолиза в тканях жертвы.

Поскольку большинство видов рыб являются зоофагами (Рыбы..., 2015), в тканях которых преобладают белки, наибольшее внимание уделяется ферментам, гидролизующим белковые компоненты пищи (Кузьмина, 2018). Вместе с активностью пептидаз (протеиназ) ранее изучали преимущественно у морских представителей типа членистоногих, Arthropoda в частности у десятиногих раков Decapoda (Dendinger, 1987; Glass, Stark, 1994; Boetius, Felbeck, 1995; Diaz-Tenorio et al., 2006; Navarrete del Toro et al., 2006; Sriket et al., 2011). Сведения о температурных характеристиках пептидаз, функционирующих в организме объектов питания молоди всех видов рыб и взрослых бентофагов, обитающих в пресноводных водоемах, фрагментарны (Кузьмина, 1999; Скворцова и др., 2016). Однако в последние десятилетия показано, что различные антропогенные факторы, включая Ф и его производные, оказывают существенное влияние на активность пищеварительных гидролаз рыб (Кузьмина, 2018).

Известно, что Ф, образующийся в процессе метаболизма водных организмов, а также в процессе биохимического разложения и трансформации органических веществ, происходящих в воде и донных отложениях, не представляет угрозу для экосистем (Michałowicz, Duda, 2007; Ali et al., 2011). Однако при попадании в воду отходов промышленного производства, особенно предприятий нефте- и сланцеперерабатывающей, коксо- и целлюлозно-бумажной, деревообрабатывающей, металлургической, а также анилинокрасочной промышленности, Ф и его производные становятся опасными для гидробионтов (Лукьяненко, 1983; Флеров, 1989; Michałowicz, Duda, 2007; Gad, Saad, 2008; Mai et al., 2012; Singh, Chandra, 2019).

Ф вызывает дисфункцию центральной нервной системы (Матей, 1970; Лукьяненко, 1983; Флеров, 1989), в значительной мере из-за блокирования ионных каналов (Michałowicz, Duda, 2007). Кроме того, он вызывает некроз кожи, повреждает жабры, почки, мышцы, глаза и иммунную систему. Также Ф и его производные оказывают негативное влияние на активность пептидаз

кишечника у большинства исследованных видов рыб (Тарлева и др., 2018). Сведения о влиянии Ф на активность и характеристики ферментов объектов питания рыб крайне скудны. Наибольший интерес представляют личинки хирономид, играющих в пищевых сетях водных экосистем одно временно роль консумента и жертвы (Гусаков, 2007; Рыбы..., 2015). Известно, что Ф модифицирует активность и температурные характеристики пептидаз личинок хирономид при нейтральных значениях рН (Кузьмина и др., 2017). Однако процессы индуцированного аутолиза проходят при кислых значениях рН (Уголев, 1985; Кузьмина, 2000). Сведения о влиянии Ф на активность и температурные характеристики пептидаз целого организма личинок хирономид при разных значениях рН в доступной литературе отсутствуют.

Цель работы – получить сведения о влиянии Ф на активность и температурные характеристики пептидаз, функционирующих во всем организме личинок хирономид, при различных значениях рН в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – личинки хирономид *Chironomus* sp. Средняя масса одной личинки 7.5 ± 0.5 мг. Для определения активности и характеристик пептидаз использован метод смешанных проб (Егорова и др., 1974). В качестве ферментативно активных препаратов использовали гомогенаты предварительно измельченных и тщательно перемешанных десятков личинок. Все операции проводили на холоде. Аликвоты образцов (0.5–1.0 г) гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с небольшим количеством раствора Рингера для холоднокровных животных (103 мМ NaCl, 1.9 мМ KCl, 0.45 мМ CaCl₂, рН 3.0, 5.0 или 7.4) при температуре 2–4°C. Для этого стеклянный гомогенизатор помещали в стакан со льдом. Гомогенат далее разбавляли раствором Рингера до конечного разведения 1 : 99 (масса/объем).

Температурную зависимость определяли в диапазоне температур 0–70°C (шаг – 10°C).

Для оценки влияния Ф (фирма “Вектон”, г. Санкт-Петербург) на активность пептидаз в целом организме личинок хирономид 0.25 мл гомогената и 0.25 мл Ф в начальной концентрации 0.5 ммоль/л (47.1 мг/л) предварительно инкубировали в течение 1 ч при постоянном перемешивании. После прединкубации концентрация Ф была 0.25 ммоль/л или 23.5 мг/л. Затем в пробирку добавляли 0.5 мл 1%-ного субстрата (казеина или гемоглобина, рН 3.0, 5.0 или 7.4), приготовленного в растворе Рингера. В первом случае определяли казеинлитическую активность, во втором – гемоглобинлитическую. Смесь инкуби-

ровали еще 30 мин в специальных термостатируемых камерах при постоянном перемешивании. Все операции проводили при температуре 20°C. Активность пептидаз оценивали по увеличению концентрации тирозина с использованием реагента Фолина-Чиокалтеу (Anson, 1938). Ферментативную активность определяли в пяти биохимических повторностях ($n = 5$). Об уровне активности ферментов судили по увеличению продуктов реакции с учетом фона (количество тирозина в исходном гомогенате) в расчете на 1 г влажной ткани за 1 мин инкубации субстрата и ферментативно активного препарата, мкмоль/(г мин). Интенсивность окраски оценивали с помощью фотокolorиметра (КФК-2) при длине волны 670 нм. Кроме того, рассчитывали температурные коэффициенты (Q_{10}), а также значения энергии активации ($E_{\text{акт}}$), которые определяли при помощи графического метода Аррениуса и формуле:

$$E_{\text{акт}} = 2.3 \times 1.987 T_2 T_1 (\lg V_2 - \lg V_1) / (T_2 - T_1),$$

где 2.3 – модуль перехода десятичного в натуральный логарифм, 1.987 – газовая постоянная, T – температура, °К (°К = °С + 273), V – скорость реакции.

Результаты обработки статистических данных представлены в виде средних значений и их ошибок ($M \pm m$). Значимость различий между показателями оценивали с использованием критерия Стьюдента для малых выборок при $p \leq 0.05 - p < 0.001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние фенола на активность и температурную зависимость пептидаз личинок хирономид по казеину при разных значениях рН. Активность казеинлитических пептидаз всех тканей контрольных особей личинок хирономид при температуре 20°C и рН 7.4 выше, чем при рН 5.0 в 2.2 раза, при 40°C – в 1.4 раза (табл. 1). В присутствии Ф активность казеинлитических пептидаз в указанных условиях увеличивается, наиболее значительно при 20°C и рН 5.0. Изучение активности пептидаз в широком диапазоне температур позволило выявить различия в форме кривых температурной зависимости казеинлитических пептидаз, функционирующих в отсутствие и в присутствии Ф при разных значениях рН (рис. 1).

Сравнение полученных данных указывает на значительное влияние рН на характер температурной зависимости пептидаз, функционирующих в присутствии Ф. Особо следует отметить достоверное ($p \leq 0.01 - 0.001$) увеличение активности казеинлитических пептидаз при рН 5.0 почти во всем диапазоне температур, тогда как при рН 7.4 уровень ферментативной активности заметно повышается только в зоне температур 30–50°C (достоверно при 40 и 50°C, $p \leq 0.001$ и $p \leq 0.01$ соответственно). В диапазоне жизнедеятельности ли-

Таблица 1. Влияние фенола на активность казеинлитических и гемоглобинлитических пептидаз при различных значениях температуры и рН

Субстрат	рН	Ферментативная активность, мкмоль/(г мин) при	
		20°C	40°C
Казеин	5.0	0.37 ± 0.02 $1.21 \pm 0.17^{**}(3.3)$	1.17 ± 0.06 $2.35 \pm 0.21^{**}(2.0)$
	7.4	0.81 ± 0.14 $0.94 \pm 0.20(1.2)$	1.65 ± 0.13 $3.72 \pm 0.21^{**}(2.3)$
Гемоглобин	3.0	0.64 ± 0.09 $2.27 \pm 0.35^{**}(3.5)$	1.22 ± 0.17 $2.82 \pm 0.49(2.3)$
	5.0	1.03 ± 0.35 $2.08 \pm 0.22(2.0)$	1.42 ± 0.24 $2.78 \pm 0.11^*(2.0)$
	7.4	0.74 ± 0.19 $1.37 \pm 0.08^*(1.9)$	3.10 ± 0.53 $4.08 \pm 0.22(1.3)$

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 над чертой – в отсутствие фенола, под чертой – в присутствии фенола, в скобках – степень увеличения ферментативной активности (раз).

* $p \leq 0.05$ достоверные различия между опытом и контролем.
** $p < 0.001$.

чинок хирономид (10–30°C), а также в зоне 60–70°C значения активности казеинлитических пептидаз чрезвычайно близки. Относительная активность пептидаз в зоне 0–30°C в присутствии Ф при рН 5.0 выше, при рН 7.4 – ниже, чем в контроле.

Влияние фенола на активность и температурную зависимость пептидаз личинок хирономид по гемоглобину при разных значениях рН. Максимальная активность гемоглобинлитических пептидаз всех тканей контрольных особей личинок хирономид при температуре 20°C отмечена при рН 5.0, при температуре 40°C – при рН 7.4 (табл. 1). В присутствии Ф активность гемоглобинлитических пептидаз достоверно ($p \leq 0.05 - p \leq 0.001$) повышается. При этом эффект при обеих температурах последовательно снижается от рН 3.0 до рН 7.4. Исследование активности гемоглобинлитических пептидаз в широком диапазоне температур в отсутствие и в присутствии Ф также выявило различия в форме кривых температурной зависимости (рис. 2). Относительная активность гемоглобинлитических пептидаз, как правило, недостоверно увеличивается, особенно при рН 5.0.

Влияние фенола на температурные коэффициенты (Q_{10}) активности пептидаз личинок хирономид. Данные о температурных коэффициентах активности пептидаз личинок хирономид в широком диапазоне температур свидетельствуют, что в большинстве случаев они < 2.0 , а в зоне постмаксимальных температур < 1.0 (табл. 2). В диапазоне жизнедеятельности личинок хирономид в присутствии Ф значения Q_{10} активности казеинлити-

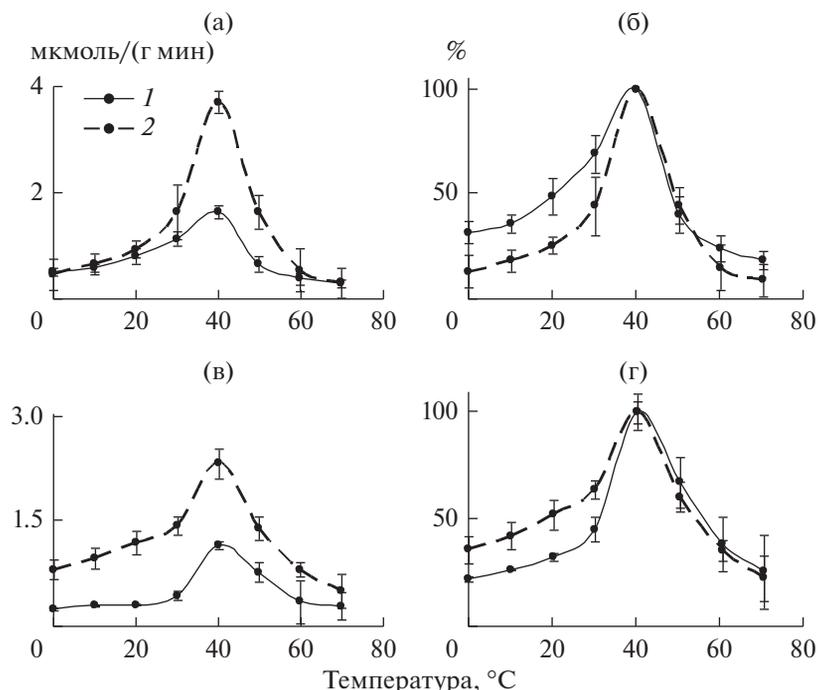


Рис. 1. Влияние фенола на температурную зависимость казеинлитических пептидаз у личинок хирономид при pH 7.4 (а, б) и pH 5.0 (в, г): а, в – активность ферментов, мкмоль/(г мин), б, г – относительная активность ферментов, % максимальной активности. 1 – отсутствие фенола (контроль), 2 – наличие фенола (опыт).

ческих пептидаз при pH 5.0 и гемоглобинлитических пептидаз при pH 3.0 снижаются, при более высоких значениях pH изменяются разнонаправленно.

Влияние фенола на энергию активации пептидаз личинок хирономид. Данные, касающиеся $E_{акт}$ пептидаз, функционирующих в тканях личинок

хирономид в интервале температур их жизнедеятельности (0–30°C), указывают на зависимость величины показателя от используемого субстрата, pH и наличия Φ (табл. 3). Прежде всего, важно отметить наличие изгиба на графике Аррениуса во всех вариантах эксперимента при 20°C. В контроле значения $E_{акт}$ пептидаз, гидролизующих ка-

Таблица 2. Влияние фенола на значения Q_{10} пептидаз, функционирующих в целом организме личинок хирономид в исследованном диапазоне температур

Субстрат	Q_{10}						
	0–10°C	10–20°C	20–30°C	30–40°C	40–50°C	50–60°C	60–70°C
pH 3.0							
Гемоглобин	<u>1.1</u>	<u>1.2</u>	<u>1.6</u>	<u>2.1</u>	<u>0.4</u>	<u>0.5</u>	<u>0.7</u>
	1.1	1.4	1.4	1.6	0.6	0.6	0.8
pH 5.0							
Казеин	<u>1.2</u>	<u>1.2</u>	<u>1.4</u>	<u>2.2</u>	<u>0.6</u>	<u>0.4</u>	<u>0.8</u>
	1.2	1.2	1.2	1.6	0.6	0.6	0.6
Гемоглобин	<u>2.0</u>	<u>1.6</u>	<u>1.5</u>	<u>1.4</u>	<u>0.6</u>	<u>0.4</u>	<u>0.2</u>
	1.6	1.7	1.5	1.2	0.8	0.6	0.3
pH 7.4							
Казеин	<u>1.1</u>	<u>1.4</u>	<u>1.4</u>	<u>1.4</u>	<u>0.4</u>	<u>0.6</u>	<u>0.7</u>
	1.4	1.4	1.8	2.3	0.4	0.3	0.6
Гемоглобин	<u>1.7</u>	<u>1.4</u>	<u>1.9</u>	<u>2.2</u>	<u>0.4</u>	<u>0.4</u>	<u>0.4</u>
	1.3	1.5	1.5	2.0	0.6	0.4	0.2

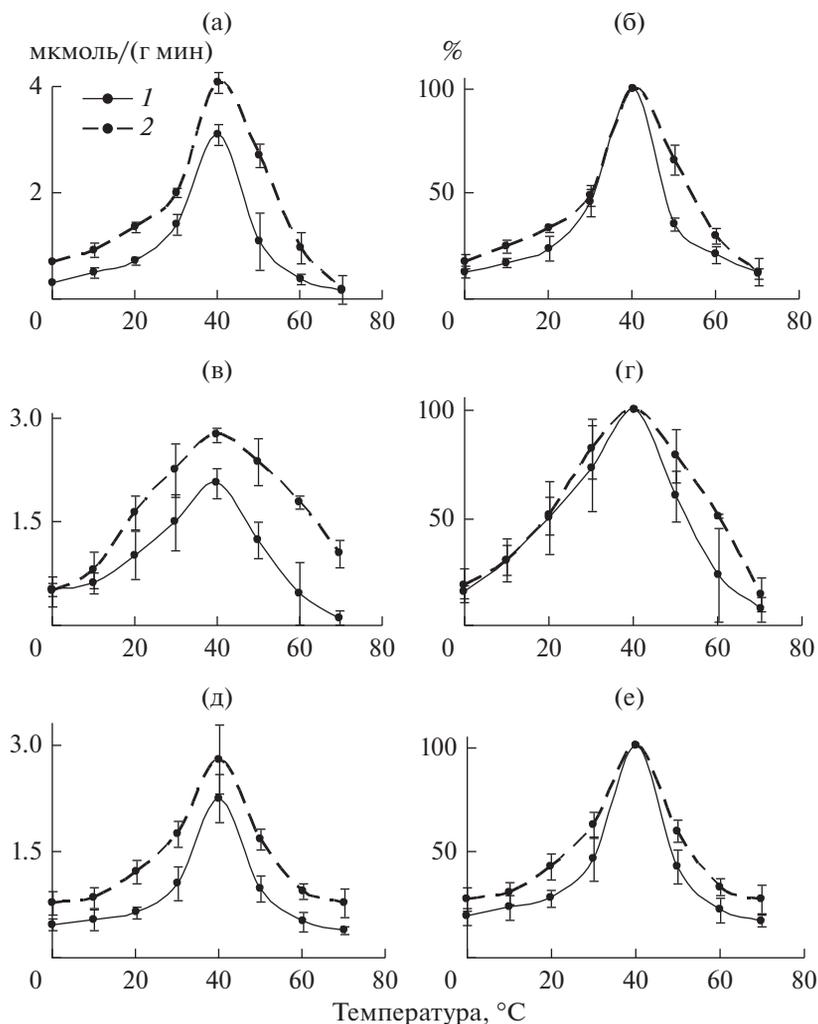


Рис. 2. Влияние фенола на температурную зависимость гемоглоблилитических пептидаз у личинок хирономид при рН 7.4 (а, б), рН 5.0 (в, г) и рН 3.0 (д, е): а, в, д – активность ферментов, б, г, е – относительная активность ферментов. Остальные обозначения, как на рис. 1.

зеин, в диапазоне 0–20°C при рН 5.0 и рН 7.4 в 3.4 и 1.9 раза ниже, чем в зоне более высоких температур, особенно в первом случае. Следовательно, эффективность процесса гидролиза белков казеинлитическими пептидазами в зоне низких температур выше, чем в зоне высоких. В присутствии Ф значения $E_{\text{акт}}$ в этих зонах различаются: в низкотемпературной зоне при рН 5.0 не изменяются, в высокотемпературной зоне уменьшаются в 1.7 раза, при рН 7.4 значения $E_{\text{акт}}$ в обеих температурных зонах увеличиваются в 1.6 и 1.9 раза соответственно.

Значения $E_{\text{акт}}$ пептидаз, гидролизующих гемоглобин, при рН 3.0 в диапазоне 0–20°C в 4.5 раза ниже, чем в зоне более высоких температур, при рН 7.4 – в 1.9 раза. При рН 5.0, напротив, значения $E_{\text{акт}}$ в диапазоне 0–20°C выше, чем в зоне более высоких температур. В присутствии Ф значения $E_{\text{акт}}$

в указанных диапазонах температур в большинстве случаев уменьшаются в 1.2 или 1.3 раза. Лишь при рН 3.0 наблюдается увеличение показателя в первом случае и снижение во втором – в 1.5 раза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Прежде всего, следует отметить, что у позвоночных при рН 7.4 в гомогенатах слизистой оболочки кишечника преобладает активность эндопептидаз (трипсина, химотрипсина и эластазы), а также экзопептидаз (карбоксипептидаз, аминокпептидаз и различных дипептидаз). При рН 3.0 и 5.0 доминирует активность различных катепсинов (Кузьмина, 2018). Активность пищеварительных пептидаз наиболее детально изучена у морских членистоногих. В частности, активность трипсиноподобных и химотрипсиноподобных ферментов выявлена у целого ряда десятиногих

Таблица 3. Влияние фенола на значения энергии активации пептидаз, функционирующих у личинок хирономид в диапазоне температур их жизнедеятельности

Субстрат	Энергия активации, ккал/моль	
	до точки перегиба	после точки перегиба
pH 3.0		
Гемоглобин	<u>2.4</u>	<u>11.5</u>
	3.5	7.8
pH 5.0		
Казеин	<u>3.1</u>	<u>10.5</u>
	3.1	6.1
Гемоглобин	<u>9.5</u>	<u>6.3</u>
	8.2	4.8
pH 7.4		
Казеин	<u>3.5</u>	<u>6.5</u>
	5.5	12.6
Гемоглобин	<u>6.8</u>	<u>13.2</u>
	5.1	10.1

Примечание. Точка перегиба 20°C (наличие изгиба на графике Аррениуса во всех вариантах эксперимента при 20°C).

раков (Dendinger, 1987; Kim et al., 1994; Van Wormhoudt et al., 1995; Navarrete del Toro et al., 2006). Имеются сведения о наличии у ракообразных лейцинаминопептидазы и карбоксипептидаз А и В (Dendinger, 1987; Boetius, Felbeck, 1995; Glass, Stark, 1994). Следует отметить, что у гигантской пресноводной креветки *Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879 при pH 7.0 в мышечном экстракте обнаружена активность калпаинов и катепсина L, тогда как в экстракте гепатопанкреаса – главным образом, трипсина и химотрипсина (Sriket et al., 2011). В тканях пресноводной креветки *M. nipponese* De Naan, 1849 выявлена кДНК, кодирующая катепсин L (Zhao et al., 2013), катепсин В (Stephens et al., 2012; Li et al., 2013) и катепсин С (Qiu et al., 2008). Эти данные позволяют предположить, что личинки хирономид также обладают широким спектром пептидаз. При этом высокая активность гемоглоблинитических пептидаз, а также доминирование в организме личинок хирономид фракции растворимых белков, соответствующей фракции гемоглобина (Кузьмина, 2018), свидетельствуют об их важной роли в процессах индуцированного аутолиза.

Данные, касающиеся активности казеин- и гемоглоблинитических пептидаз, функционирующих в тканях личинок хирономид, а также величины оптимума температуры при нейтральных значениях pH близки полученным ранее (Скворцова и др., 2016). Диапазон значений температурного оптимума различных пептидаз у ракообразных достаточно широк. Максимальные значения

(70°C) характерны для казеинлитической пептидазы гепатопанкреаса креветки *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck, 1765) (Oh et al., 2000) и трипсина у рака *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Kim et al., 1994), минимальные (50°C) – у личинок хаоборуса *Chaoborus* sp. (Кузьмина, 1999). Значения температурного оптимума химотрипсина ниже, чем трипсина. Максимальные значения (50–55°C) отмечены у камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* (Tilesius, 1815) (Мухин, Новиков, 1999) и крабов-плавунцов *Callinectes bellicosus* (Stimpson, 1859) и *C. arcuatus* Ordway, 1863 (Diaz-Tenorio et al., 2006), минимальные (40°C) – у антарктической креветки *Chorismus antarcticus* (Pfeffer, 1887) (Dittrich, 1990). По-видимому, относительно низкий уровень (40°C) температурного оптимума пептидаз в тканях личинок хирономид в наших опытах в значительной мере обусловлен их обитанием в бореальной зоне.

Также важно отметить, что активность пептидаз у личинок хирономид при использовании обоих субстратов в присутствии Ф увеличивается и при 20°C, и при 40°C. При 20°C наибольшее увеличение активности казеинлитических пептидаз отмечено при pH 5.0, гемоглоблинитических – при pH 3.0 (зоне действия катепсинов). Действительно, из гепатопанкреаса креветки *Penaeus vannamei* Voone, 1931 (*Litopenaeus vannamei*) изолирован L-подобный катепсин с оптимумом pH 5.1 (Le Boulay et al., 1996). У обыкновенного омара *Homarus gammarus* L. один пик выявлен при pH 5.8–6.0, другой – при pH 2.5–3.0 (Navarrete del Toro et al., 2006). Известно, что в зоне pH 2.5–4.0 функционируют катепсины D, E и A, в зоне 5.0–6.0 – катепсины В и L, в зоне 7.0–8.0 – катепсин С (по: Кузьмина, 2018).

Зарегистрирован различный характер изменения формы кривых температурной зависимости пептидаз личинок хирономид при разных значениях pH в присутствии Ф. Казеинлитическая активность пептидаз личинок хирономид под влиянием Ф при pH 7.4 значительно увеличивается лишь при оптимальной температуре и в меньшей степени при 30 и 50°C. При pH 5.0 активность пептидаз под влиянием Ф увеличивается фактически во всем диапазоне исследованных температур. Однако относительная активность пептидаз при нейтральных значениях pH под влиянием Ф снижается, особенно в зоне температур жизнедеятельности личинок хирономид. При pH 5.0, напротив, в указанной зоне относительная активность пептидаз в опыте повышается по сравнению с контролем. Активность гемоглоблинитических пептидаз под влиянием Ф увеличивается при всех значениях pH: при pH 3.0 – в диапазоне 0–60°C, при pH 5.0 – 10–70°C (особенно в зоне постмаксимальных температур), при pH 7.4 – 0–70°C. Относительная активность пептидаз под влиянием Ф при всех значениях pH увеличивается в меньшей

степени по сравнению с таковой казеинлитических пептидаз, особенно при pH 5.0. Важно отметить, что значительные различия между опытом и контролем при разных значениях pH отмечены в различных температурных зонах. Разный характер влияния Φ на казеинлитические катепсины и эндопептидазы, подобные трипсину, может свидетельствовать о значительном различии их структур, в то время как отсутствие существенных различий в эффектах Φ на гемоглобинлитические пептидазы позволяет предположить их сходство.

Изучение динамики значений Q_{10} подтвердило их резкое уменьшение в зоне постмаксимальных температур в результате денатурации белковых глобул ферментов. Однако устойчивое и ярко выраженное влияние Φ на этот показатель не обнаружено. Значительно интереснее оказались результаты изучения влияния Φ на $E_{\text{акт}}$ пептидаз, гидролизующих казеин и гемоглобин в тканях личинок хирономид. Зарегистрирован излом на графике Аррениуса при 20°C, что согласуется с ранее полученными результатами (Кузьмина, 1999). При этом в большинстве случаев в зоне более низких температур значения $E_{\text{акт}}$ ниже, чем в зоне более высоких температур. Данные, полученные при нейтральных значениях pH в этой зоне несколько ниже величин показателя трипсиноподобных протеиназ у краба-отшельника *Clibanarius striolatus* и у коричневого краба *Cancer pagurus* L. – 7.64 и 5.92 ккал/моль соответственно (Dittrich, 1992). Следовательно, эффективность процесса гидролиза белков казеинлитическими пептидазами личинок хирономид выше, чем у ракообразных. Важно, что под влиянием Φ значения $E_{\text{акт}}$ казеинлитических пептидаз при pH 5.0 не изменяются или значительно уменьшаются, при pH 7.4 – увеличиваются. Вместе с тем, для процессов индуцированного аутолиза большее значение имеет уменьшение под влиянием Φ величин $E_{\text{акт}}$ гемоглобинлитических пептидаз, поскольку их активность у личинок хирономид выше, а зона действия pH шире по сравнению с казеинлитическими пептидазами.

Эффекты Φ можно объяснить с позиций аллостерической регуляции активности ферментов. Аллостерическое регулирование наблюдается, когда регулятор (модификатор), не будучи стерическим аналогом субстрата данного фермента, может связываться с ним в центре, пространственно не совпадающем с активным центром, что вызывает изменение конфигурации и, как следствие, активности фермента (Jacob, Monod, 1961; Monod et al., 1965). Эпителий кишечника личинок хирономид покрыт микроворсинками (Kaufman et al., 1986), при этом важно отметить, что некоторые мембранные ферменты являются амфипатическими: гидрофильная часть молекулы выполняет каталитические функции, гидрофобная – якорные (Louvard et al., 1975). Кроме то-

го, предполагается, что гидрофобная часть может участвовать в поддержании оптимальной конформации фермента и регуляции свойств гидрофильной части фермента (Уголев, Кузьмина, 1993). По-видимому, Φ влияет на регуляторные сайты не только пептидаз пищеварительного тракта, но и пептидаз других органов и тканей хирономид.

Выводы. Влияние Φ на активность пептидаз, функционирующих в тканях личинок хирономид *Chironomus* sp., в значительной степени зависит от структуры субстрата, температуры и pH. Температурный оптимум исследованных пептидаз тканей личинок хирономид соответствует 40°C. В присутствии Φ активность казеинлитических пептидаз увеличивается, наиболее значительно при 20°C и pH 5.0 (в 3.3 раза), активность гемоглобинлитических пептидаз – при pH 3.0 (в 3.5 раз). Эффект при обеих температурах последовательно снижается от pH 3.0 до pH 7.4. Форма кривых температурной зависимости и величина температурного коэффициента Q_{10} в присутствии Φ наиболее заметно изменяется в зоне высоких температур. Значения $E_{\text{акт}}$ пептидаз, гидролизующих казеин и гемоглобин, в зоне низких и высоких температур различны. В присутствии Φ значения $E_{\text{акт}}$ казеинлитических пептидаз при pH 7.4 увеличиваются, при pH 5.0 – уменьшаются в зоне высоких температур, гемоглобинлитических пептидаз – в большинстве случаев уменьшаются. Полученные данные свидетельствуют о значительном влиянии Φ не только на активность, но и на pH-зависимые температурные характеристики пептидаз, функционирующих в организме личинок хирономид.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность Е.А. Куливацкой (Институт биологии внутренних вод РАН) за техническую помощь в работе.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Высоцкая Р.У., Немова Н.Н. 2008. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб. Москва: Наука.
- Гусаков В.А. 2007. Мейобентос Рыбинского водохранилища. Москва: Товарищество научных изданий КМК.
- Егорова В.В., Иезуитова Н.Н., Тимофеева Н.М. и др. 1974. Некоторые температурные характеристики и температурные адаптации ферментов, обеспечивающих мембранное пищеварение у пойкило-

- термных и гомойотермных животных // Журн. эвол. биохим. физиол. Т. 10. № 3. С. 223.
- Иванова М.Н., Половкова С.Н., Кияшко В.И., Баканов А.И. 1978. Питание и пищевые взаимоотношения рыб в водохранилищах Волжского каскада // Теоретические аспекты рыбохозяйственных исследований водохранилищ. Ленинград: Наука. С. 55.
- Кузьмина В.В. 1999. Влияние температуры на пищеварительные гидролазы беспозвоночных животных // Ж. эволюц. биохим. физиол. Т. 35. № 1. С. 15.
- Кузьмина В.В. 2000. Вклад индуцированного аутолиза в процессы пищеварения вторичных консументов на примере гидробионтов // Докл. РАН. Т. 373. № 1. С. 132.
- Кузьмина В.В. 2018. Процессы пищеварения у рыб. Новые факты и гипотезы Ярославль: Филигрань.
- Кузьмина В.В., Чорная Е.Ю., Куливацкая Е.А., Шенцицкий В.А. 2017. Влияние фенола на температурные характеристики пептидаз личинок хирономид – потенциальных объектов питания рыб-бентофагов // Пробл. биол. продукт. жив. № 4. С. 48.
- Лукьяненко В.И. 1983. Общая ихтиотоксикология. Москва: Легк. и пищ. пром-сть.
- Матей В.Е. 1970. Влияние субтоксических концентраций фенола на условнорефлекторную деятельность гуппи // Гидробиол. ж. Т. 6. № 3. С. 100.
- Мухин В.А., Новиков В.Ю. 1999. Выделение, очистка и характеристика комплекса протеиназ из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschatica* // Тез. докл. XX науч.-техн. конф. профес.-препод. состава МГТУ. Мурманск: Мурманск. гос. техн. ун-т. С. 354.
- Рыбы Рыбинского водохранилища: популяционная динамика и экология. 2015. Ярославль: Филигрань.
- Скворцова Е.Г., Егорова А.А., Кузьмина В.В. 2016. Влияние температуры и кислотности среды на активность пептидаз у личинок хирономид – потенциальных объектов питания рыб-бентофагов // Пробл. биол. продукт. жив. № 4. С. 46.
- Тарлева А.Ф., Шенцицкий В.А., Кузьмина В.В. 2018. Реакция различных систем организма рыб на фенол и его производные (обзор) // Пробл. биол. продукт. жив. № 4. С. 27.
- Уголев А.М. 1985. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. Ленинград: Наука.
- Уголев А.М., Кузьмина В.В. 1993. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. Санкт-Петербург: Гидрометеоиздат.
- Флеров Б.А. 1989. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. Санкт-Петербург: Наука.
- Ali S.M., Sabac S.Z., Fayed M. et al. 2011. The influence of agro-industrial effluents on River Nile pollution // J. Adv. Res. V. 2. P. 850.
- Anson M. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J. Gen. Physiol. V. 22. P. 79.
- Boetius A., Felbeck H. 1995. Digestive enzymes in marine invertebrates from hydrothermal vents and other reducing environments // Mar. Biol. Berlin; Heidelberg. V. 122. № 1. P. 105.
- Dendinger J.E. 1987. Digestive proteases in the midgut gland of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus* // Comp. Biochem. Physiol. V. 88B. № 2. P. 503. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(87\)90334-8](https://doi.org/10.1016/0305-0491(87)90334-8)
- Diaz-Tenorio L.M., Garcia-Carreño F.L., Ángeles Navarrete del Toro M. 2006. Characterization and comparison of digestive proteinases of the Cortez swimming crab, *Callinectes bellicosus*, and the arched swimming crab, *Callinectes arcuatus* // Invertebrate Biol. V. 125. № 2. P. 125.
- Dittrich B. 1990. Temperature dependence of the activities of trypsin-like proteases in decapod crustaceans from different habitats // Naturwissenschaften. Bd 77. S. 491. <https://doi.org/10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2018.3.27-44>
- Dittrich B. 1992. Comparative studies on the thermal properties of a trypsin-like protease in two hermit crabs // Helgoländer Meeresuntersuchung: Helgoländer Meeresunters. V. 46. P. 45.
- Gad N.S., Saad A.S. 2008. Effect of environmental pollution by phenol on some physiological parameters of *Oreochromis niloticus* // Global Veterin. V. 2. P. 312.
- Glass H.J., Stark J.R. 1994. Protein digestion in the European lobster, *Homarus gammarus* (L.) // Compar. Biochem. Physiol. V. 108B. № 2. P. 225.
- Jacob F., Monod J. 1961. On the regulation of gene activity // Cold spring Harbor Symp. Quant. Biol. V. 26. P. 193.
- Kaufman M.G., Pankratz H.S., Klug M.J. 1986. Bacteria Associated with the Ectoperitrophic Space in the Midgut of the Larva of the Midge *Xylotopus par* (Diptera: Chironomidae) // Appl. Environ. Microbiol. V. 51. № 3. P. 657.
- Kim H.R., Meyers S.P., Pyeun J.H., Godber J.S. 1994. Enzymatic properties of anionic trypsin from the hepatopancreas of crayfish, *Procambarus clarkia* // Comp. Biochem. Physiol. V. 107B. P. 197.
- Le Boulay C., Van Wormhoudt A., Sellos D. 1996. Cloning and expression of cathepsin L-like proteinases in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* during the intermolt cycle // J. Comp. Physiol. V. 166. B. № 5. P. 310. <https://doi.org/10.1007/BF02439917>
- Li X., Mengeng X., Kong J. et al. 2013. Molecular cloning and characterisation of a cathepsin B gene from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* // Fish Shellfish Immunol. V. 35. № 5. P. 1604.
- Louvard D., Maroux S., Vannier C., Desnuelle P. 1975. Topological studies on the hydrolases bound to the intestinal brush membrane. 1. Solubilization by papain and triton x-100 // Biochim. Biophys. Acta. V. 375. № 1. P. 236.
- Mai I.D. 2012. Experimental exposure of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) to phenol: Clinical evaluation, tissue alterations and residue assessment // J. Adv. Res. V. 3. P. 177.
- Michałowicz J., Duda W. 2007. Phenols – Sources and Toxicity // Polish J. Environ. Stud. V. 16. № 3. P. 347.
- Monod J., Wyman J., Changeux J.-P. 1965. On the nature of allosteric transitions: A plausible model // J. Mol. Biol. V. 12. № 1. P. 88.
- Navarrete del Toro M.A., García-Carreño F.L., Díaz L.M. et al. 2006. Aspartic proteinases in the digestive tract of marine decapod crustaceans // J. Exp. Zool. V. 305A. P. 645. <https://doi.org/10.1002/jez.a.318>
- Oh E.-S., Kim D.-S., Kim J.H., Kim H.-R. 2000. Enzymatic properties of a protease from the hepatopancreas of

- shrimp, *Penaeus orientalis* // J. Food Biochem. V. 24. P. 251.
- Pinder L.C.V. 1986. Biology of freshwater Chironomidae // Ann. Rev. Entomol. V. 31. P. 1.
- Qiu L., Jians S., Huang J. et al. 2008. Molecular cloning and mRNA expression of cathepsin C gene in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) // Comp. Biochem. Physiol. V. 150A. № 3. P. 320.
- Singh A.K., Chandra R. 2019. Pollutants released from the pulp paper industry. Aquatic toxicity and their health hazards // Aquat. Toxicol. V. 211. P. 202.
- Sriker C., Benjakul S., Vissessangual W. 2010. Characterisation of proteolytic enzymes from muscle and hepatopancreas of fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) // J. Sci. Food Agric. V. 91. № 1. P. 52.
- Stephens A.I., Rojo L., Araujo-Bernal S. et al. 2012. Cathepsin B from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence analysis, tissue-specific expression and biological activity // Comp. Biochem. Physiol. V. 161B. № 1. P. 32.
- Van Wormhoudt A., Sellos D., Donval A. et al. 1995. Chymotrypsin gene expression during the intermolt cycle in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea; Decapoda) // Experientia. V. 51. № 2. P. 159.
<https://doi.org/10.1007/bf01929362>
- Wardiatno Y., Krisanti M. The Vertical Dynamics of Larval Chironomids on Artificial Substrates in Lake Lido (Bogor, Indonesia) // Tropic. Life Sci. Res. 2013. V. 24. № 2. P. 13.
- Zhao W., Chen L., Zhang F. et al. 2013. Molecular characterization of cathepsin L cDNA and its expression during oogenesis and embryogenesis in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* (Palaemonidae) // Gen. Mol. Res. V. 12. № 4. P. 5215.
- Zilli F.L., Montalto L., Paggi A., Merchese C. 2008. Biometry and life cycle of *Chironomus calligraphus* Goeldi 1905 (Diptera, Chironomidae) in laboratory conditions // Asociacion Interciencia. V. 33. № 10. P. 767.

The Effect of Phenol on the Activity and Temperature Characteristics of Peptidases in Chironomid Larvae at Different pH Values

V. V. Kuz'mina^{1, *}, E. Yu. Chornaya², and V. A. Sheptitskiy²

¹Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Nekouzskii raion, Yaroslavl oblast, Russia

²Shevchenko State University, PO Box 3300, Tiraspol, Moldova

*e-mail: vkuzmina@ibiw.ru

The effect of phenol (Ph, 0.25 mmol/L) on the activity and temperature dependence of casein- and hemoglobinolytic peptidases functioning in the whole organism of chironomid larvae *Chironomus* sp. within the temperature range of 0–70°C at different pH values (3.0, 5.0 and 7.4) was investigated. The temperature optimum of the studied peptidases of chironomid larvae corresponds to 40°C. Under the influence of phenol, the activity of caseinolytic peptidases increases, more significantly at 20°C and pH 5.0 (3.3 times), that of hemoglobinolytic peptidases – at pH 3.0 (3.5 times). The effect successively decreases from pH 3.0 up to pH 7.4. under both temperatures. In the presence of phenol, the shape of the curves of the temperature dependence and the Q₁₀ values transform most significantly in the zone of high temperatures. The values of activation energy (E_{act}) of the process of hydrolysis of casein and hemoglobinolytic peptidases in the zone of low and high temperatures are different. In the presence of phenol, E_{act} values of the process of hydrolysis of casein caseinolytic peptidases at pH 7.4 are increased, at pH 5.0 they decreased in the zone of high temperatures. E_{act} values of the process of hydrolysis of hemoglobinolytic peptidases are decreased in most cases. The mechanisms of the influence of phenol on peptidase activity and digestive processes in fish-benthophagous eating of chironomid larvae are discussed.

Keywords: chironomide larvae, phenol, peptidases, temperature dependence, pH