УДК 636.5.087.7

КАРБОГІДРАЗНА АКТИВНІСТЬ У КИШЕЧНИКУ ОДНОРІЧОК КОРОПІВ РІЗНИХ ПОРІД

Ю. М. ЗАБИТІВСЬКИЙ, І. І. ГРИЦИНЯК, Я. В. ТУЧАПСЬКИЙ, Р. І. ПІРУС

Інститут рибного господарства УААН

Наведені дані про активність карбогідраз, які беруть участь у порожнинному та мембранному травленні, у однорічок коропів різних порід, яких вирощують у ставах західного регіону України. Досліджено активність мембранних ферментів, які розташовані на глікокаліксі, у його товщі та на мембрані ентероцитів. Показано, що існує відмінність між активністю цих ферментів у кишечнику риб різних порід.

Ключові слова: КОРОП, ТРАВЛЕННЯ, КАРБОГІДРАЗИ, КИШЕЧНИК.

Ефективність використання поживних речовин, зокрема вуглеводів корму, рибами значною мірою залежить від активності у кишечнику карбогідраз – великої групи ферментів, які відносяться до класу глікозидаз, котрі розщеплюють о-глікозидний зв'язок в олігосахаридах і інших вуглеводних сполуках. Крім того, у розщепленні вуглеводів корму беруть участь бактеріальні карбогідрази [13]. Карбогідразна активність у кишечнику риб залежить від їх виду [6], умов утримання [14], хімічного складу води [4, 5], складу раціону [12, 15], сезонного і добового ритмів [8]. У зв'язку з цим, науково-практичний інтерес становить дослідження інших факторів, зокрема генетичних, на активність карбогідраз у кишечнику коропа. Даних такого плану ми в літературі не виявили. Тому метою нашої роботи було порівняльне дослідження сумарної активності карбогідраз у різних ділянках кишечника залежно від їх локалізації – у глікокаліксі, мембранах та порожнині кишечника - однорічок коропа різних порід, які поширені у західному регіоні України.

Матеріали і методи

Дослідження проведені у Львівському відділенні Інституту рибного господарства УААН на однорічках галіційського коропа (ГК), гібрида любінського лускатого коропа і амурського сазана (КСГ), любінського лускатого коропа (ЛЛК) та любінського рамчастого коропа (ЛРК). Риби вирощувалися в однакових умовах. Коропів кожної породної групи виловлювали з зимувальних ставів і поміщали в акваріуми, де вони аклімувалися протягом 20-ти діб. У цей період їх підгодовували оліґохетами (Tubifex tubifex) та висушеними дафніями. За одну добу до експерименту годівлю припиняли. Загальну активність карбогідраз визначали за приростом глюкози, що звільняється при гідролізі крохмалю, який входив у інкубаційне середовище. Його склад наступний: розчин Рінгера для холоднокровних: NaCl - 0,6 %, KCl - 0,0075 %, $CaCl_2$ - 0,01 %, $NaHCO_3$ - 0,01 % ; крохмаль розчинний - 2 %; тритон Х-100 - 0,01 %.

Для дослідження активності карбогідраз, які беруть участь в мембранному гідролізі, використовували метод послідовної десорбції ферментів з відрізку кишечника, для визначення порожнинної активності – метод перфузії [6, 7, 9]. Кишечник цьоголіток коропа умовно ділили на три фрагменти. Перша, проксимальна ділянка, простягається від стравоходу до першої петлі. Друга, медіальна - від першої до останньої петлі, третя - дистальна - від останньої петлі до анального отвору. Вийнятий кишківник відразу занурювали в охолоджений до 3 - 4 ^{o}C розчин Рінгера і пінцетом акуратно звільняли від прилеглих тканин. Розрізали кишечник на умовні ділянки, кожну з яких перфузували 5 мл 0,01 % Тритону Х-100, виготовленого на розчині Рінгера. З медіальної ділянки вибирали фрагмент, розміщений між другою та четвертою петлею. Кожну ділянку ділили на три приблизно одинакові частини, розрізали вздовж і на фіксаторі поміщали в пробірку з інкубаційним розчином. Пробірки розміщували в термостаті для інкубації при температурі

37 ^{o}С. Інкубація і солюбілізація відбувалась при постійному перемішуванні через кожних дві - три хвилини протягом десяти, п'ятьдесяти і дев'яносто хвилин. Після закінчення інкубації фрагменти кожної ділянки кишечника виймали, а з фермент-субстратного розчину відбирали по 0,4 мл для визначення вмісту білка за методом Лоурі [1]. Фермент-субстратний розчин поміщали на вісім хвилин у киплячу водяну баню для припинення ферментної реакції і потім визначали кількість гідролізованої глюкози орто-толуїдиновим методом [10].

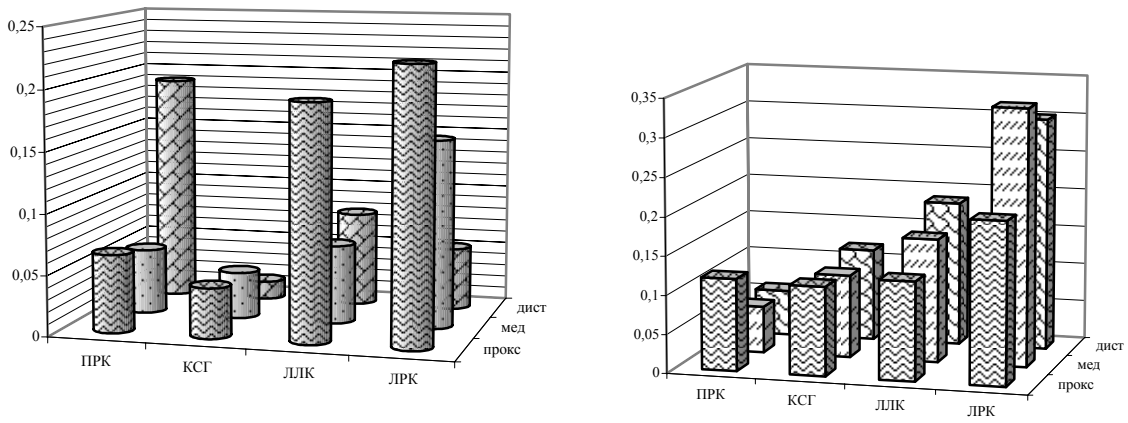
Цифрові дані опрацьовані методами варіаційної статистики з допомогою комп'ютерних програм [2].

Результати й обговорення

З наведених на рис. 1а даних видно, що у проксимальній ділянці кишечника найвища активність порожнинних карбогідраз спостерігається у любінських рамчастого і лускатого коропів. У цій ділянці спостерігається значне коливання індивідуальної активності карбогідраз кишечника: у ЛЛК в межах 0,254 – 0,641, у ЛРК – 0,090 – 0,540 ммоль глюк х мг$^{-1}$ білка х хв$^{-1}$ відповідно. Хоча у проксимальній ділянці в цілому у ЛЛК і ЛРК процеси порожнинного гідролізу вуглеводів проходять значно швидше, порівняно з ПРК і КСГ, однак їх не можна вважати критерієм породної ідентифікації внаслідок перекривання площ показників індивідуальної карбогідразної активності більш, ніж на 50 %.

У медіальній ділянці кишечника у ЛЛК і ЛРК активність порожнинних карбогідраз нижча, ніж у проксимальній. У дистальній ділянці порожнинний гідроліз вуглеводів зазвичай знижується, однак однорічки ПРК мають вищу карбогідразну активність у цій ділянці. Вірогідність середнього арифметичного < 0,95, що свідчить про високу індивідуальну мінливість дистального гідролізу у риб цієї породної групи.

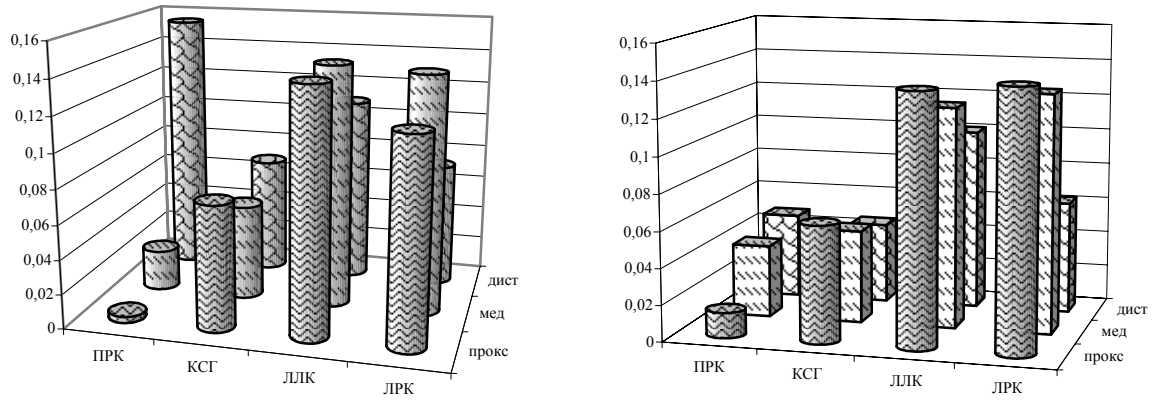
Відомо, що порожнинні ферменти адсорбуються на поверхні глікокаліксу і беруть активну участь у процесах мембранного гідролізу [7]. Проведені дослідження мембранної активності карбогідраз показали наступне. З рис. 1б бачимо, що активність карбогідраз, адсорбованих на поверхні глікокаліксу у всіх коропів після зимівлі однакова, за винятком ЛРК, у якого активність поверхневого мембранного гідролізу вуглеводів є вищою. Очевидно, це зумовлено швидкою адсорбцією порожнинних карбогідраз, активність яких у ЛРК є також високою (рис.1а). Висока активність цих ферментів у ЛРК виявлена також у медіальній та дистальній ділянках кишечника. Порівняно висока активність карбогідраз, які локалізовані на поверхні глікокаліксу у проксимальній ділянці, а також гідролітичний потенціал дистальної ділянки кишківника ЛРК дозволяє йому ефективніше використовувати корми з високим вмістом вуглеводів.



а) б)

Рис.1. **Середні величини активності карбогідраз у різних порід коропа (ммоль глюк х мг$^{-1}$ білка х хв$^{-1}$): а) порожнинні ферменти; б) карбогідрази на поверхні глікокаліксу,**

солюбілізовані протягом 10-ти хв. Тут і на рис 2: прокс – проксимальна ділянка; мед – медіальна ділянка; дист – дистальна ділянка кишечника.



а) б)

Рис.2. **Середні величини активності карбогідраз у різних порід коропа (ммоль глюк х мг$^{-1}$ білка х хв$^{-1}$): а) мембранні карбогідрази, які локалізовані в глибині глікокаліксу (солюбілізовані протягом 50 хв); б) власне мембранні карбогідрази, солюбілізовані протягом 90 хв.**

ЛЛК і КСГ мають подібний розподіл активності поверхневих мембранних гідролітичних ферментів у кишечнику. Найнижча поверхнева мембранна активність є у ПРК. Очевидно, у цих риб основна роль у гідролізі вуглеводів відводиться карбогідразам, які вільно розміщені у просвіті кишечника (рис 1а). Інтенсивність їх настільки висока, що це розвантажує поверхню глікокаліксу і робить його транзитною системою, для продовження гідролітичних процесів як у товщі, так і на мембрані, про що свідчать дані на рис. 2а і 2б. Оскільки порожнинні ферменти, в основному, гепатопанкреатичного походження, то активність травних процесів у ПРК залежить від функціонального стану цього органу, у той час, як в інших порід коропа вона значною мірою підтримується ентероцитарними гідролітичними білками.

У глибині глікокаліксу карбогідрази розташовані на мукополісахаридних нитках і відіграють важливу роль у розщепленні олігосахаридів. Це в основному власне кишкові ферменти, які продукуються ентероцитами, хоча є дані про поступлення поверхневих карбогідраз у товщу глікокаліксу [11]. З даних, наведених на рис. 2а, видно, що власне кишкові ферменти у ЛЛК, ЛРК і КСГ продукуються ентероцитами, а їх активність приблизно однаково розподілена вздовж кишкового тракту, з незначними індивідуальними відхиленнями. У ПРК вона зростає у проксимо- дистальному градієнті, причому досить помітним є пік активності у дистальній ділянці (0,1548 ± 0,0587 ммоль глюк х мг$^{-1}$ білка х хв$^{-1}$). У дистальній ділянці ПРК є досить велика кількість ферментів як ентероцитного, так і порожнинного походження.

До карбогідраз, які солюбілізувалися протягом 90 хв належать, у більшості, власне кишкові ферменти, серед яких є інтегральні білки, вмонтовані у мембрану (рис. 2б). Велика частина їх бере участь не лише в гідролізі вуглеводів, а й є частиною гідролітично-транспортного механізму. Їх активність зумовлюється станом всмоктування глюкози та інших низькомолекулярних цукрів. Найвищі показники активності цієї групи карбогідраз виявлені у ЛЛК і ЛРК. Низхідний проксимо-дистальний градієнт активності карбогідраз спостерігається у КСГ, ЛЛК, ЛРК; лише у ПРК він є позитивний. У ЛЛК і ЛРК у проксимальній та медіальній ділянках активність мембранних карбогідраз є вищою у 5 – 9,7 разів порівняно з ПРК і КСГ. Припускаємо, що наявність високого гідролітично-транспортного потенціалу дозволяє коропам цих породних груп після зимівлі ефективніше засвоювати вуглеводні компоненти корму, порівняно з іншими досліджуваними породами.

Висновки

1. Між коропами досліджуваних порід після зимівлі існує відмінність у активності гідролітичних процесів за участю карбогідраз. У ПРК існує механізм заключного дистального гідролізу порожнинного травлення, який проявляється у позитивному проксимо-дистальному градієнті активності всіх досліджуваних карбогідраз, а також у рівні активності мембранних карбогідраз, які локалізовані в глибині глікокаліксу у дистальній ділянці, яка є вищою, між КСГ, ЛЛК і ЛРК у 2,2; 1,5; 2,1 рази відповідно.
2. З досліджуваних порід однорічки ЛРК після зимівлі мають найвищу активність мембранних карбогідраз, які локалізовані на поверхні глікокаліксу вздовж кишківника. У медіальній ділянці кишечника активність вуглеводневого гідролізу ЛРК перевищує таку у ПРК у 5,6 разів, у КСГ у 3,1 рази і у ЛЛК у 2 рази. Це дозволяє їм ефективно засвоювати корми з вищим вмістом вуглеводів.
3. Однорічки КСГ відзначаються рівномірним розподілом активності мембранних карбогідраз вздовж кишкового тракту в межах 0,015 – 0,115 ммоль глюк х $мг^{-1}$ білка х $хв^{-1}$.

Yu. M. Zabytivskyy, I. I. Hryzynjak, Ya. V. Tuchapskyy, R. I. Pirus

CARBOHYDRASE ACTIVITY OF A ONE YEAR CARP OF DIFFERENT BREEDS

Activity cavernous and membrane carbohydrases of a one year carp of different breeds, growing in ponds has been developed. It is investigated activity membrane enzymes which are on gkycocalix, in his thickness and on a membrane cell of the intestine. It is revealed, that lubin`s frames and scaly carps have the high carbohydrase activity in a proxymal part. At mixed frams carps it is established hyperactivity carbohydrase in distal a part that allows them to use forages with carbohydrates hardly accessible to hydrolysis.

The Institute for Fisheries of the Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

1. Государственная фармакопея СССР. XI-е издание, выпуск 2. Общие методы анализа. М.: Медицина, 1990. - С. 31, 34 - 35.
2. *Деркач М., Гумецький Р., Чабан М.* Курс біометрії. Львів.: "Вища школа". 1974. - 73с.
3. Забитівський Ю.М. Вплив сублетальних концентрацій свинцю на активність травних ферментів цьогорічок коропів // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. - 2002. Вип. 28. - С. 200 - 210.
4. *Забитівський Ю.М.* Карбогідразна активність кишківника рамчастої та лускатої порід коропа любінського внутрішньопорідного типу під впливом міді // Наукові записки Тернопільського педуніверситету ім. Володимира Гнатюка. Серія “Біологія”, № 2(17), 2002. – С.105 – 109.
5. *Забитівський Ю.М.* Функціональна активність карбогідраз цьогорічок коропів любінського внутрішньопорідного типу при інтоксикації свинцем // Наукові записки Тернопільського педуніверситету ім. Володимира Гнатюка. Серія “Біологія”. - 2001. № 3 (14). - С. 193 - 195.
6. *Кузьмина В.В.* Распределение активности карбогидраз вдоль кишечника у некоторых видов пресноводных рыб // Вопросы ихтиологии. 1985. Т.25. вып.4.С.674 - 679.
7. *Кушак Р.И.* Пищеварительно-транспортная система энтероцитов. Рига.: Зинатне, 1983.- 304 с.
8. *Неваленный А.Н., Егоров С.Н.* Суточная динамика суммарной карбогидразной активности кишечника карпа Cyprinus carpio, выращиваемого в прудовых условиях // Вопросы ихтиологии. - 1995. Т.35, N4, С.549 - 552.
9. *Соболев Л.Б.* Морфофункциональная характеристика пищеварительной системы молоди карпа, выращиваемой в прудах: Дис... канд. біолог. наук: 03.00.10. - М., 1991. - 169 с.
10. *Сухомлинов Б.Ф., Чайка Я.П., Коробов В.Н.* Методические указания к лабораторным занятиям по физико-химическим методам современной биохимии. Для студентов биологического факультета. Львов. - 1987. - С. 45.
11. *Уголев А.М.* (ред) Мембранный гидролиз и транспорт: Новые данные и гипотезы, Л. 1986. -240 с.

12. *Alarcón F.J. Martínez T.F. Díaz M. Moyano F.J.* Characterization of digestive carbohydrase activity in the gilthead seabream (Sparus aurata) // Hydrobiologia.- V. 445, N 1-3, 2001.- P. 199-204(6).
13. *Izvekova G.* Activity of Carbohydrases of Symbiotic Microflora and Their Role in Processes of Digestion of Fish and Their Parasitizing Cestodes (on the Example of Pike and *Triaenophorus nodulosus*)// Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.- V. 41, N 4, 2005. - P. 406-414(9).
14. *Papoutsoglou, Eustratios S; Lyndon, Alastair R* Effect of incubation temperature on carbohydrate digestion in important teleosts for aquaculture// Aquaculture Research.- V. 36, N 13, 2005.-P. 1252-1264(13).
15. *Papoutsoglou; Lyndon*. Digestive enzymes of *Anarhichas minor* and the effect of diet composition on their performance // Journal of Fish Biology.- V. 69, N 2, 2006.- P. 446-460(15).