

**АКТИВНОСТЬ ЭСТЕРАЗ В ТКАНЯХ РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛОВ  
ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ****Э.А. ЕФИМЦЕВА, Т.И. ЧЕЛПАНОВА**

Определяли активность эстеразных ферментов в экстрактах тканей различных органов желудочно-кишечного тракта северных оленей. Обсуждается взаимосвязь между эстеразной активностью в эпителиальных тканях желудочно-кишечного тракта и биотрансформацией ксенобиотиков, в том числе инсектицидных препаратов, содержащих в своей структуре эфирные или амидные связи. Показано, что наибольшей эстеразной активностью характеризуются ткани преджелудков, наименьшей — слизистая оболочка толстого кишечника.

**Ключевые слова:** эстеразная активность, желудочно-кишечный тракт, северный олень, *Rangifer tarandus* L.

Эстеразы (КФ 3.1.) — большая группа ферментов, катализирующих реакции гидролиза, синтеза, переэтерификации сложных эфиров различных физиологически активных веществ: карбоновых кислот, гормонов, витаминов, аминокислот. Они обладают широкой субстратной специфичностью и действуют на сложноэфирные и амидные связи как в нативных, так и в искусственных субстратах. Эстеразы обнаружены во многих тканях млекопитающих, причем в каждой может содержаться несколько ферментов этой группы. Среди них чаще всего выделяют пять основных типов гидролаз эфиров карбоновых кислот (КФ 3.1.1.): ацетилхолинэстеразу (АХЭ, КФ 3.1.1.7), холинэстеразу (ХЭ, КФ 3.1.1.8) и неспецифические эстеразы — карбоксилэстеразу (КЭ, КФ 3.1.1.1), арилэстеразу (КФ 3.1.1.2), ацетилэстеразу (КФ 3.1.1.6). Тканевой и видовой специфичностью обладают также множественные молекулярные формы этих ферментов (1, 2).

Определение активности эстераз в тканях отделов желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных представляет интерес из-за использования в ветеринарной практике соединений, содержащих эфирные или амидные связи. К ним относятся некоторые пестициды, остаточные количества которых в кормах часто служат причиной токсикозов животных, а также некоторые антгельминтики, другие фармакологические средства. Отдельные инсектициды токсичны для теплокровных животных и вызывают нежелательные изменения на биохимическом уровне (3, 4). Под действием неспецифических эстераз некоторые фосфорорганические соединения способны превращаться в органах и тканях животных в метаболиты высокой токсичности. Однако эти ферменты осуществляют и защитную функцию: катализируют гидролиз отдельных чужеродных соединений, в том числе инсектицидных препаратов, или связывают значительную часть таких средств, ослабляя их действие. Обратимо связанные эстеразами препараты можно рассматривать и как своеобразное депо, обеспечивающее их пролонгированное действие на вредителей (5, 6). До 90-х годов прошлого столетия в качестве инсектицидов широко применяли фосфорорганические и карбаматные соединения, действие которых направлено на ингибирование активности ацетил- и холинэстеразы у эндо- и эктопаразитов. В последние годы разрабатывают и внедряют в ветеринарную практику препараты нового типа, обладающие широким спектром действия: производные макроциклических лактонов, а также синтетические и природные пиретроиды. Эти препараты воздействуют на ионные потоки  $Cl^-$  и  $Na^+$  в мембранах клеток нервной и мышечной ткани паразитов, что приводит к нарушению проводимости нервных импульсов, параличу и гибели вредителей (7), как и при

инактивации АХЭ и ХЭ фосфорорганическими и карбаматными инсектицидами. Среди лактонов и пиретроидов одни соединения по химической природе являются эфирами и могут подвергаться в организме гидролизу (8), другие — образовывать в процессе метаболизма промежуточные продукты в виде эфиров (9).

В практике оленеводства против кровососущих насекомых и личинок овода применяют инсектицидные средства. Некоторые препараты вводят перорально, и процесс их всасывания происходит в пищеварительном тракте. Характер распределения эстеразной активности в тканях желудочно-кишечного тракта может оказывать влияние на всасывание, токсичность и избирательность действия используемых средств.

В задачу нашей работы входила оценка общей эстеразной активности в тканях разных отделов желудочно-кишечного тракта северного оленя с целью выявления участков возможной биотрансформации соединений с эфирными и амидными связями.

*Методика.* Материалом для исследования служили образцы тканей рубца, сетки, книжки, сычуга, двенадцатиперстной, тощей, подвздошной, ободочной, слепой и прямой кишки северного оленя *Rangifer tarandus* L., взятых во время зимнего забоя животных (г. Воркута, Республика Коми). Пробы тканей размером приблизительно 3×3 см промывали физиологическим раствором от крови, механических частиц непереваренной пищи, химуса и экскрементов и помещали в жидкий азот для транспортировки и дальнейшего хранения. Размороженные кусочки тканей готовили для анализа следующим образом: использовали отделенные от стенки ворсинки рубца; стенки сетки и книжки гомогенизировали целиком, слизистую оболочку сычуга и тканей всех отделов кишечника отделяли от подлежащего серозно-мышечного слоя. Образцы тканей гомогенизировали в ступках с кварцевым песком в соотношении 1:5 (масса ткани/объем физиологического раствора). Гомогенаты центрифугировали в течение 20 мин при 13 000 об/мин на центрифуге Mini Spin Eppendorf (Германия). Затем супернатанты разбавляли физиологическим раствором в следующих соотношениях: гомогенат рубца — 1:100, книжки и сетки — 1:50, сычуга — 1:2, двенадцатиперстной и тощей, подвздошной и ободочной, слепой и прямой кишок — соответственно 1:40, 1:10 и 1:2.

Эстеразную активность определяли по ранее описанному методу (10). Изменение оптической плотности, обусловленное накоплением в реакционной среде продукта ферментативной реакции п-нитрофенола, образующегося в результате гидролиза ароматического эфира п-нитрофенилацетата, регистрировали на спектрофотометре Unicam SP-1800 (Англия) против холостой пробы при  $\lambda = 400$  нм и температуре 25 °С. Общий объем реакционной среды составлял 2,5 мл: 0,5 мл 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,4); 0,05-0,1 мл исследуемого экстракта ткани; 1 мл  $10^{-3}$  М раствора субстрата п-нитрофенилацетата; до указанного объема пробу доводили дистиллированной водой. Эстеразную активность выражали в микромолях п-нитрофенола, образующегося за 1 мин после внесения субстрата, в расчете на 1 мг белка. Содержание белка в исследуемых пробах определяли по Лоури (11). Данные представляли в виде средней арифметической со стандартной ошибкой. Для статистической обработки использовали критерий Стьюдента.

*Результаты.* Ткани отделов желудочно-кишечного тракта северных оленей различались по эстеразной активности. Наиболее высоким показателем характеризовались преджелудки, особенно ткань рубца —  $14,97 \pm 3,04$  мкмоль п-нитрофенола/(мин · мг белка). В тканях книжки и сетки общая эстеразная активность была одинаковой и в 2 раза ниже, чем в рубце

( $P < 0,05$ ) (табл.). В переднем отделе многокамерного желудка жвачных животных происходит всасывание воды, питательных веществ, осуществляется активный и пассивный транспорт ионов и различных метаболитов. Микрофлора рубца является источником специфических метаболитов — летучих жирных кислот (уксусной, пропионовой, масляной), которые служат для жвачных важным энергетическим субстратом (12). Наличие большого количества метаболитов определяет интенсивность протекания в ткани этого отдела желудочно-кишечного тракта реакций, катализируемых эстеразами: этерификации летучих жирных кислот, гидролиза и переэтерификации эфиров. Инсектицидные препараты, имеющие в своей структуре эфирную или амидную связь, при пероральном введении, по-видимому, могут частично разрушаться в эпителии преджелудков под воздействием неспецифических эстераз до неактивных продуктов, что может снижать их токсичность для животных и ослаблять эффект специфического действия на вредителей.

**Общая эстеразная активность в тканях различных отделов желудочно-кишечного тракта северных оленей ( $X \pm m$ )**

Отдел желудочно-кишечного тракта	Эстеразная активность, мкмоль п-нитрофенола/(мин · мг белка)
Рубец ( $n = 8$ )	14,97±3,04
Сетка ( $n = 8$ )	7,62±1,79*
Книжка ( $n = 8$ )	7,6±1,56*
Преджелудки в целом	10,07±1,67**
Сычуг ( $n = 8$ )	0,25±0,03*
Двенадцатиперстная кишка ( $n = 8$ )	1,93±0,26*
Тощая кишка ( $n = 6$ )	0,64±0,12*
Подвздошная кишка ( $n = 6$ )	0,63±0,20*
Тонкий кишечник в целом	1,06±0,12**
Слепая кишка ( $n = 9$ )	0,066±0,02
Ободочная кишка ( $n = 8$ )	0,057±0,015
Прямая кишка ( $n = 9$ )	0,115±0,017
Толстый кишечник в целом	0,079±0,01**

Примечание.  $n$  — число животных.  
\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

В разных отделах желудочно-кишечного тракта оленей величина рН неодинакова (13), что влияет на процессы всасывания как питательных, так и токсичных веществ. Эстеразная активность слизистой оболочки сычуга оказалась в 40 раз ниже, чем в тканях преджелудков ( $P < 0,05$ ). В сычуге оленя кислотность среды характеризуется достаточно низ-

кими значениями рН (1,9-2,7 против 6,0-7,0 химуса преджелудков); в его содержимом имеется большое количество жидкости; отсутствуют условия для жизнедеятельности микрофлоры, продуцирующей низкомолекулярные эфиробразующие кислоты (13).

Общая эстеразная активность тканей постепенно уменьшалась от проксимального к дистальному концу кишечника. Максимальное значение этого показателя выявлено в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки, минимальное — в тканях толстого кишечника (соответственно  $1,93 \pm 0,26$  и  $0,079 \pm 0,012$  мкмоль п-нитрофенола/(мин · мг белка),  $P < 0,05$ ). Среди слизистых тонкого кишечника относительно высокой эстеразной активностью характеризовалась слизистая двенадцатиперстной кишки, тогда как в тканях тощей и подвздошной кишок этот показатель был в 3 раза ниже ( $P < 0,05$ ) (см. табл.). Такая высокая ферментативная активность предполагает активное участие эстераз эпителия слизистой оболочки тонкого кишечника в процессах пищеварения, всасывания и транспорта эндогенных липидов. Наиболее низкая активность отмечена в клетках эпителия ободочной, слепой и прямой кишки по сравнению с абсолютными показателями в тканях преджелудков, сычуга и тонкого кишечника ( $P < 0,05$ ) (см. табл.). В толстом кишечнике оленей, как и в преджелудках, поддержание щелочных условий в энтеральной среде (рН около 6,1) (13) очень важно для жизнедеятельности бактериальной флоры, продуцирующей короткоцепочечные жирные кислоты, но здесь со-

держание микрофлоры гораздо меньше и, вероятно, обмен сложных эфиров карбоновых кислот не имеет такого физиологического значения.

Таким образом, в тканях разных отделов желудочно-кишечного тракта северного оленя *Rangifer tarandus* L. выявлена неодинаковая эстеразная активность, что указывает на различия в интенсивности синтеза, гидролиза, переэтерификации сложных эфиров карбоновых кислот, аминокислот и других жизненно важных метаболитов, а также их транспорта. Ткани, которые характеризуются высокой активностью эстераз, допустимо рассматривать как возможные зоны деградации чужеродных соединений, в том числе инсектицидных препаратов, содержащих сложноэфирные или амидные связи. И наоборот, в эпителиальных тканях отделов желудочно-кишечного тракта с низкой эстеразной активностью всасывание ксенобиотиков может повышаться.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Holmes R.S., Masters C.J. A comparative study of the multiplicity of mammalian esterases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 151(1): 147-158.
2. Шубин П.Н., Ефимцева Э.А. Биохимическая и популяционная генетика северного оленя. Л., 1988.
3. Казановский Е.С. Токсичность инсектицидов для северных оленей. *Ветеринария*, 1978, 12: 94.
4. Nieminen M., Timisjarvi J., Laitinen M. The effects of antiparasitic treatment on the condition of semi-domestic reindeer (*Rangifer tarandus*). Reports from the Kavo Subarctic Research Station (Finland), 1980, 16: 23-26.
5. Розенгарт В.И., Шерстобитов О.Е. Избирательная токсичность фосфорорганических инсектоакарицидов. Л., 1978.
6. Бресткин А.П., Никольская Е.Б., Ефимцева Э.А. Сравнительная чувствительность двух карбоксилэстераз из печени северного оленя к некоторым ингибиторам. *Биохимия*, 1986, 51(7): 1141-1149.
7. Macrocyclic lactones. NRA Special Review. Series 98.3. Canberra, Australia, 1988.
8. Ross M.K., Borazjani A., Edwards C.C. e.a. Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. *Biochem. Pharmacol.*, 2006, 71(5): 657-669.
9. Chiu S-H.L., Carlin J.R., Taub R. e.a. Comparative metabolic disposition of ivermectin in fat tissues of cattle, sheep and rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 1988, 16(5): 728-736.
10. Wunne D., Ginsburg S., Shaltin Y. Beef liver esterase. Kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1973, 154: 204-211.
11. Lowry O.N., Rosenbrough N.J., Farr A.L. e.a. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193(1): 265-275.
12. Curch D.C. Digestive physiology and nutrition of ruminants. In: *Digestive physiology*. 2<sup>nd</sup> ed. V.1. Oregon, USA, 1983.
13. Симakov А.Ф. Пищеварение северного оленя. Сыктывкар, 1993.

*Институт физиологии Коми научного центра  
Уральского отделения РАН,  
167982 г. Сыктывкар, ул. Первомайская, 50,  
e-mail: chelpanova@physiol.komisc.ru*

*Поступила в редакцию  
20 ноября 2006 года*

#### ESTERASE ACTIVITY IN THE TISSUES OF DIFFERENT REGIONS OF GASTROINTESTINAL TRACT IN REINDEER

*E.A. Efimtseva, T.I. Chelpanova*

#### S u m m a r y

The esterase activity was determined in different tissue extracts from regions of gastrointestinal tract in reindeers. The relationship between the esterase activity in the epithelial tissues of different regions of the gastrointestinal tract and the biotransformation of xenobiotics, including insecticides, containing ester- and amide bonds is discussed. It was shown that the maximum esterase activity is detected in the forestomachs, whereas the large intestine mucosa tissue possessed the minimum esterase activity. The tissues of regions with high esterase activity may be considered obviously as possible site of degradation of foreign substances, the epithelial tissues with low esterase activity absorption of xenobiotics may be increased.