

УДК 57.044+57.023

**Дроганова Т.С., Поликарпова Л.В., Петренко Д.Б., Васильев Н.В.**  
*Московский государственный областной университет*

## **АКТИВНОСТЬ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ В ПЕЧЕНИ ЖИВОРОДКИ РЕЧНОЙ (VIVIPARUS VIVIPARUS) ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ФТОРИД-ИОНА**

*Аннотация.* Получены экспериментальные данные о динамике активности кислой фосфатазы живородки речной (*Viviparus viviparus* L.) при воздействии фторида натрия, а также изменение активности фермента у подопытных животных в норме. Показано развитие стресс-реакции у моллюсков в ответ на острое токсическое воздействие. Изучена возможность накопления фторид-иона в тканях пищеварительной железы живородки речной. Выдвинута гипотеза о регулировании содержания фтора в организме моллюсков путем активного обратного транспорта.

*Ключевые слова:* кислая фосфатаза, активность ферментов, фторид-ион, гидробионты, токсичность, сублетальное воздействие.

**T. Droganova, L. Polykarpova, D. Petrenko, N. Vasilev**  
*Moscow State Regional University*

## **ACID PHOSPHATASE ACTIVITY IN THE HEPAR OF A RIVER SNAIL (VIVIPARUS VIVIPARUS L.) UNDER THE INFLUENCE OF FLUORIDE ION**

*Abstract.* We report experimental data on the dynamics of activity of acid phosphatase in a river snail *Viviparus viviparus* L. under the influence of sodium fluoride. Changes in activity of abovementioned enzymes in the experimental animals in norm are studied. The development of the stress reaction in mollusks in response to acute toxic action is shown. The possibility of accumulation of fluoride ion in the hepar of a river snail is investigated. A hypothesis for the regulation of the content of fluorine in a river snail by the active reverse transport is proposed.

*Key words:* acid phosphatase, enzyme activity, fluoride ion, hydrobionts, toxicity, sublethal effects.

В условиях интенсификации антропогенной деятельности фтор и фторсодержащие соединения становятся одними из наиболее распространенных загрязнителей окружающей среды в индустриально развитых странах, что обусловлено децентрализацией в окружающей среде отходов и выбросов нефтеперерабатывающей,

металлургической, химической, горнорудной, деревообрабатывающей промышленности [4]. В последнее время одним из факторов, влияющим на загрязнение объектов окружающей среды соединениями фтора, является разложение в атмосфере фреонов, повсеместно применяющихся в технике кондиционирования и холодильных установках [2; 11]. Газообразные и твердые соединения фтора, посту-

© Дроганова Т.С., Поликарпова Л.В., Петренко Д.Б., Васильев Н.В., 2014.

пающие в атмосферу, практически полностью выводятся из атмосферы с осадками, попадая в почву и поверхностные воды, где они способны накапливаться и включаться в звенья трофических цепей [3].

Токсическое действие фторид-иона для гидробионтов подробно изучено на рыбах [4-5]. Симптомы острого отравления фторидами – результат сложного комбинированного воздействия. Фториды служат ингибиторами таких ферментов, как эстераза, липаза, кислая фосфатаза [6; 9]. При появлении повышенных концентраций фторид-иона происходит связывание  $Ca^{2+}$  с образованием малорастворимого фторида кальция, что приводит к снижению содержания кальция в тканях [3; 6]. В литературе приведены данные о токсичности фторидов в концентрации более 1,5 мг/л для рыб и икры. При остром отравлении в жабрах и печени развиваются воспалительно-дистрофические процессы, происходит накопление фтора в жабрах и мышцах [5]. Учитывая серьезное экологическое значение вопроса, представляется целесообразным проведение исследования влияния фторид-иона на адаптационные механизмы гидробионтов.

В качестве маркера токсического воздействия возможно использование активности некоторых ферментов пресноводных гидробионтов, которое отражает уровень биохимических реакций неспецифической адаптации, позволяющих живому организму сохранять гомеостаз. В данной работе изучена динамика изменения активности кислой фосфатазы (КФ) у пресноводных моллюсков живородка речная (*Viviparus*

*viviparus*) в ответ на острое токсическое воздействие фторида натрия и в норме, а также исследована возможность накопления фторид-иона в печени моллюсков.

### Материалы и методы

Моллюсков собирали в Пестовском вдхр. (с. Тишково Пушкинского р-на Московской обл.). Перед началом эксперимента собранных животных акклиматизировали к лабораторным условиям в аквариуме с постоянной аэрацией и естественным освещением в течение 2-х недель. В качестве токсиканта использовали фторид натрия в концентрации 12 мг/л по фторид-иону (для сравнения, ПДК<sub>рыб.</sub> для фторид-иона равна 0,05 мг/л, ПДК<sub>культ-быт</sub> составляет 1,2 мг/мл). Экспозиция опыта составляла 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 и 96 ч. Контролем служили особи, отобранные из аквариума непосредственно перед опытом (при экспозиции равной 0 часов), а также содержащиеся в воде без добавления токсиканта при прочих равных условиях в течение тех же временных интервалов.

По истечении времени экспозиции отбирали по 5 особей животных, препарировали их для извлечения пищеварительной железы, из которой получали экстракт водорастворимых белков [7]. Концентрацию белка в полученных экстрактах определяли по методу Лоури [10]. Активность кислой фосфатазы (КФ) определяли фотометрически ( $\lambda=415$  нм), используя в качестве субстрата *p*-нитрофенилфосфат. Пробы инкубировались 20 мин. при 37°C в 50 мМ ацетатном буфере с рН 4,1 [9]. За единицу активности фермента (Е) принимали такое его количество, которое катализирует накопле-

ние 1 моля продукта (*p*-нитрофенола) за 1 секунду. Удельную активность ферментов рассчитывали в единицах на 1 мг белка (Е/мг белка).

Определение фтора в гомогенате пищеварительной железы проводили потенциометрическим методом на рН-метре-милливольтметре (НАН-НА-211) с использованием фторид-селективного электрода (ЭЛИТ-221) и хлорид-серебряного электрода сравнения (ЭВЛ-1МЗ), в соответствии с общепринятой методикой<sup>1</sup>. Минерализацию проб выполняли по следующей методике: 100 мкл экстракта железы помещали в стеклоуглеродный тигель, добавляли по 100 мкл 50%-го раствора пероксида водорода и 0,1 М раствора гидроксида натрия и упаривали раствор досуха при нагревании на плитке. Операцию повторяли 5 раз. Полученный осадок растворяли в 1,5 мл дистиллированной воды и количественно переносили его в пробирку. К аликвотной части раствора (500 мкл) добавляли 500 мкл буферного раствора для регулирования общей ионной силы, затем погружали электроды в анализируемый раствор и измеряли величину электродвижущей силы (ЭДС). Концентрацию фторид-иона определяли по градуировочному графику.

### Результаты и обсуждение

Как следует из полученных данных (рис. 1), активность КФ в результате воздействия фторид-иона снижается относительно контроля

в течение всего эксперимента ( $\approx 96$  ч), при этом значение активности не остается постоянным на протяжении эксперимента, а испытывает колебательные изменения как в опытной группе животных, так и в контрольной. Такие изменения находятся в соответствии с принципом существования биологических систем в состоянии подвижного равновесия с окружающей средой, что позволяет живым организмам приспосабливаться к меняющимся условиям обитания.

Изменения активности, возникающие в результате действия фторид-иона, можно разделить на три периода: 1) 0-24 часов; 2) 24-60 часов; 3) 60-96 часов (конец эксперимента). На протяжении первых 12 часов эксперимента активность КФ под воздействием фторид-иона несколько раз резко изменялась, снижаясь и повышаясь. При этом в интервалах 0-2 и 4-6 часов наблюдается угнетение активности, тогда как от 2 до 4 часов и от 6 до 12 часов активность фермента возрастает, достигая своего максимального значения. Важно отметить, что фазы снижения и повышения активности в интервале от 0 до 24 часов совпадают у моллюсков контрольной и опытной групп. Во втором периоде (24-60 часов), по-видимому, вследствие развития стресс-реакции, наблюдаются расхождения в динамике активности фермента, и она приобретает антифазный характер при воздействии токсиканта и без него.

<sup>1</sup> Межгосударственный стандарт [ГОСТ 4386-89] «Вода питьевая. Методы определения массовой концентрации фторидов», введен с 01.01.1991 г.

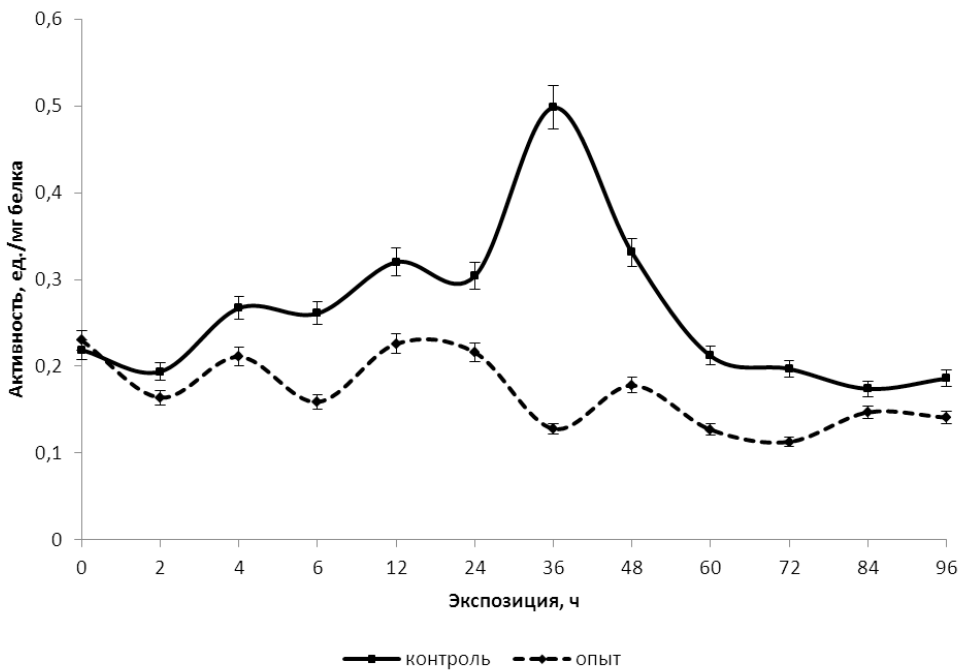


Рис. 1. Активность кислой фосфатазы в норме и при воздействии фторида натрия

Обращает на себя внимание малообъяснимое резкое увеличение активности в контрольной группе, происходящее при 36-часовой экспозиции; в экспериментальной серии в этом периоде наблюдается снижение активности фермента, сопровождающееся резким повышением концентраций фторид-иона при 30-60-часовой экспозиции (рис. 2). При экспозициях  $\geq 60$  часов изменения активности ферментов становятся более плавными, что свидетельствует об окончании процессов адаптации при некотором снижении метаболизма. Этот период характеризуется также и снижением концентрации фторид-иона.

В целом, экспериментальные данные показали, что фторид-ион не способен накапливаться в существенных количествах в тканях пи-

щеварительной железы пресноводных моллюсков живородка речная. В период 0-24 часа не фиксируется какого-либо существенного превышения концентраций фтора; в интервале от 24 до 60 часов экспозиции наблюдается существенное увеличение содержания фторида у опытной группы животных, которое почти достигает концентрации токсиканта в воде. Максимальное количество фторида отмечено при 48 часах экспозиции, в этом периоде достигается почти полное осмотическое равновесие, однако затем начинается снижение концентрации фторид-иона до значений, близких к контрольным (при экспозиции  $\approx 72$  часа). При этом концентрация фтора в резервуаре содержания опытных животных оставалась прежней – 12 мг/л.

Считается, что фтор не имеет механизмов активного транспорта через биологические мембраны, подобно некоторым ионам (натрий, калий, кальций, хлор и т.д.), и его перемещение контролируется диффузионными процессами, т.е. пассивный транспорт [1]. Вместе с тем в наших экспериментах очевидным является включение механизмов регулирования концентрации фтора в организме. Особенно это ка-

сается первой и последней экспериментальных стадий, в которых низкое содержание фтора в организме (2-4 мг/л), в сравнении с действующей концентрацией (12 мг/л) может быть объяснено только по механизму активного обратного транспорта, который позволяет выводить избыточные ионы против градиента концентрации. Такие механизмы требуют затраты метаболической энергии.

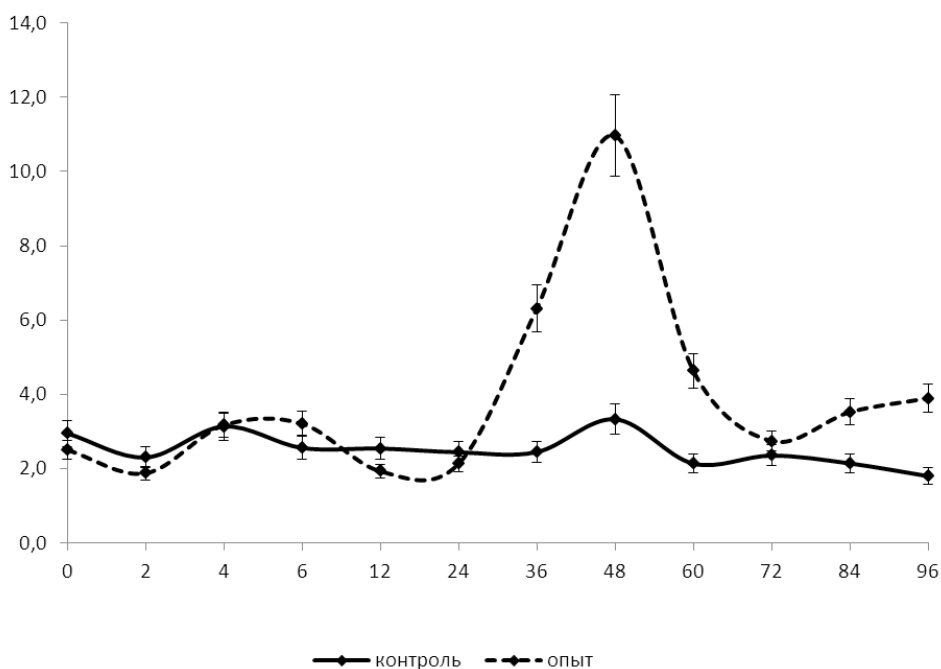


Рис. 2. Содержание фторид-иона в гепатопанкреасе в норме и при воздействии токсиканта (12 мг/л)

Таким образом, при исследовании сублетального воздействия фторид-иона на пресноводных моллюсков живородка речная в лабораторных условиях, моделирующих натурные условия, показано: а) воздействие фтора является токсичным и снижает активность кислой фосфатазы живородки речной; б) адаптационные процессы частично

компенсируют стресс-воздействие в период 24-60 часов. Относительная устойчивость гидробионтов к токсическому воздействию является результатом биохимических процессов, включающих механизмы выведения нежелательного элемента — фтора из организма живородки речной против градиента концентраций, что, безусловно, является

интересным фактом, требующим дальнейшего изучения.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Авцын А.П. Микроэлементозы человека (этиология, классификация, органо-патология) / А.П. Авцын, А.А. Жаворонков, М.А. Риш и др. – М.: Медицина, 1991. – 483 с.
2. Васильев Н.В., Петренко Д.Б. Делокализация фтора в связи с реализацией Монреальского протокола по озонобезопасным фреонам // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. 2013. № 4. С. 54-58.
3. Вредные химические вещества (Неорганические соединения V-VIII групп): справ. изд. / под ред. В.А. Филова и др. – Л.: Химия, 1989. – 592 с.
4. Грушко Я.М. Вредные неорганические соединения в промышленных сточных водах. – Л.: Химия, 1979. – 160 с.
5. Метелев В.В., Канаев А.И., Дзасохова Н.Г. Водная токсикология. – М.: Колос, 1971. – 248 с.
6. Плетнева Т.В. Токсикологическая химия. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 512 с.
7. Цветков И.Л., Попов А.П., Коничев А.С. Активность кислой фосфатазы и дезоксирибонуклеазы у гидробионтов под влиянием различных токсических веществ водной среды // Гидробиол. журнал. – 2012. – Т. 48 (№ 1). – С. 95-108.
8. Шеховцова Т.Н., И.Л. Митюрева, М.В. Швецкая и др. Использование кислых фосфатаз для определения микроколичеств анионов / Т.Н. Шеховцова // Журн. аналит. химии. – 1991. – Т. 46 (№ 3). – С. 571-577.
9. Heinonen J.K., Lahti R.A. A new and convenient colorimetric determination to the assay of inorganic pyrophosphatase // Anal. Biochem. – 1981. – Vol. 113 (№ 2). – P. 313-317.
10. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosenbrought, A.L. Farr et al. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193 (№ 2). – P. 265-275.
11. Rompp A. Haloacetates in Fog and Rain / A. Rompp, O. Klemm, W. Fricke et al. // Environ. Sci. & Technol. – 2001. – Vol. 35. – P. 1294-1298.