

УДК 57.044+57.023

Дроганова Т.С., Поликарпова Л.В., Цветков И.Л.
Московский государственный областной университет

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АДАПТАЦИЯ РЕЧНОЙ ЖИВОРОДКИ *VIVIPARUS VIVIPARUS L.* К СУБЛЕТАЛЬНОМУ ТОКСИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Аннотация. Получены экспериментальные данные о динамике активности кислой фосфатазы и дезоксирибонуклеазы речной живородки (*Viviparus viviparus L.*) в ответ на острое токсическое воздействие хрома (VI), а также изменения активности этих ферментов у подопытных животных в норме. Показано, что активность изученных ферментов колеблется по отношению к исходному значению как в опытной группе, так и у контрольных животных, содержащихся в течение опыта в воде без токсиканта. Фазы и абсолютные значения прироста и падения активности ферментов в опыте и контроле не совпадают. Постулируется необходимость вычисления относительных значений изменения активности ферментов в опыте по отношению к контролю.

Ключевые слова: тяжелые металлы, токсичность, гидролитические ферменты, ДНКаза, кислая фосфатаза, адаптация.

T.Droganova, L. Polykarpova, I. Tsvetkov
Moscow State Regional University (Moscow, Russia)

METABOLIC ADAPTATION OF RIVER SNAIL *VIVIPARUS VIVIPARUS L.* TO THE SUBLETHAL TOXIC EFFECTS OF HEAVY METALS

Abstract. We report experimental data on the dynamics of activity of acid phosphatase and deoxyribonuclease in a snail *Viviparus viviparus L.* in response to acute toxic action of chrome (VI). Changes in the activity of the above-mentioned enzymes in the experimental animals in norm are studied. Activity of the studied enzymes is shown to vary in comparison to a reference value, both in the treated group and in the control animals that were not subjected to toxic action. Periods of fluctuation and absolute values of changes in the enzyme activity in the treated and control groups do not coincide. The data obtained show the need for calculation of relative values of changes in the enzyme activity in the treated group in comparison to the control group.

Keywords: heavy metals, toxicity, hydrolytic enzymes, DNAse, acid phosphatase, enzyme activity, chromium (VI) compounds, potassium dichromate, adaptation.

Среди многообразия загрязняющих веществ, поступающих в водоёмы, для гидробионтов одной из наи-

более опасных групп являются соли тяжёлых металлов, детали действия которых на отдельные стороны их метаболизма остаются мало изученными. Некоторые из них обладают мутаген-

© Дроганова Т.С., Поликарпова Л.В., Цветков И.Л., 2014.

ными и канцерогенными свойствами. Токсичность тяжёлых металлов зависит не только от их общего содержания в воде, но и от соотношения их гидратированных ионов и связанных в комплексы с растворёнными органическими веществами или адсорбированными на взвешенных частицах. На живые организмы их физиологическое действие различно и зависит от природы металла, типа соединения, в котором он существует в природной среде, а также его концентрации [3; 5]. Наиболее часто встречаемыми загрязнителями являются Cr (III), Cr (VI), Pb (II), Hg (II), Cd (II).

Металл-токсикант, попав в водоем, распределяется между компонентами водной экосистемы, однако не всякое его количество вызывает патологические изменения в ней. При оценке способности экосистемы сопротивляться внешнему токсическому воздействию принято говорить о буферной емкости экосистемы, которую характеризует такое количество токсиканта, которое существенно не нарушает естественного характера ее функционирования. При этом металл-токсикант может содержаться в водоеме в различных формах: растворенной, связанной и удерживаемой, например, донными отложениями в виде седиментационных частиц, сорбированной и аккумулятивной планктоном или неживыми взвешенными частицами, а также растворенными органическими веществами. В последнем случае общая концентрация токсиканта в воде не меняется [5].

Соединения трех- и шестивалентного хрома попадают в поверхностные воды в результате выщелачивания из пород (хромит, крокоит, уваровит и

др.). Некоторые количества поступают в процессе разложения организмов и растений, из почв. Значительные количества могут поступать в водоемы со сточными водами гальванических цехов, красильных цехов текстильных предприятий, кожевенных заводов и предприятий химической промышленности. Понижение концентрации ионов хрома может наблюдаться в результате потребления их водными организмами и процессов адсорбции.

В поверхностных водах соединения хрома находятся в растворенном и взвешенном состояниях, соотношение между которыми зависит от состава вод, температуры, pH водоема. К тому же имеют место сезонные колебания концентрации: в зимний период она максимальна, а летом вследствие активного роста биомассы снижается. В речных незагрязненных и слабозагрязненных водах содержание хрома колеблется от нескольких десятых долей микрограмма в литре до нескольких микрограммов в литре, в загрязненных водоемах оно достигает нескольких десятков и сотен микрограммов в литре.

В растворенной форме хром может находиться в виде хроматов и дихроматов. При аэробных условиях Cr(VI) переходит в Cr(III), соли которого в нейтральной и щелочной средах гидролизуются с выделением гидроксида. Наиболее токсичны соединения хрома (V) и (VI). Независимо от пути попадания в организм гидробионтов, в первую очередь поражается выделительная система, также нарушаются функции пищеварительной железы. Соединения Cr(VI) и Cr(III) в повышенных количествах обладают канцерогенными свойствами, поражают

центральную нервную систему, оказывают повреждающее действие на репродуктивную функцию. Наиболее опасны соединения Cr(VI), вызывающие первичной и вторичной структур белков и ДНК [4].

Токсическое действие металлов проявляется на метаболическом, клеточном, организменном, популяционном, биоценоотическом и экосистемном уровнях. У обитателей водоёмов происходит изменение активности и состава множественных форм целого ряда ферментов, подавляется синтез белков, может изменяться проницаемость клеточных мембран, вязкость цитоплазмы и другие физико-химические параметры клеток, наблюдается нарушение отдельных физиологических функций, изменение поведения, снижение темпа роста, увеличение смертности вследствие прямого отравления или уменьшения устойчивости к стрессовым состояниям внешней среды [2]. В настоящей работе нами исследовано влияние соединений хрома (VI) на активность некоторых гидролитических ферментов (ДНКазы и кислая фосфатаза) на примере пресноводного моллюска живородка речная.

Материалы и методы

Подопытных животных собирали в р. Вязь (около с. Тишково Пушкинского р-на Московской обл.), а акклимацию к лабораторным условиям проводили в аквариуме с постоянной аэрацией в течение 2-х недель. В качестве токсиканта использовали дихромат калия в концентрации 0,06 мг/л, что соответствует величине 10 ПДК_{водн.} (ПДК_{водн.} для оксида хрома (VI) равна 0,002 мг/л). Экспозиция опыта состав-

ляла 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 и 96 ч. Контролем служили особи, отобранные из аквариума непосредственно перед опытом (т.е. экспозиция была равна 0 ч), а также содержащиеся в воде без токсиканта при прочих равных условиях в течение тех же 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 и 96 ч.

По истечении экспозиции отбирали по 6 особей животных, препарировали их для извлечения пищеварительной железы, из которой получали экстракт водорастворимых белков [9]. Концентрацию белка в полученных экстрактах определяли по методу Лоури [11]. Активность кислой фосфатазы (КФ) определяли фотометрически, используя в качестве субстрата *p*-нитрофенилфосфат [10], активность дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) – флуорометрически с флуоресцентно-меченым олигонуклеотидом в качестве субстрата [8]. За единицу активности фермента (Е) принимали такое его количество, которое катализирует превращение 1 моль субстрата (для ДНКазы) или накопление 1 моля продукта (для КФ) за 1 секунду. Активность ферментов выражена в единицах на 1 мг белка (Е/мг белка).

Результаты и обсуждение

Активность КФ в результате воздействия дихромата калия остается ниже контроля в течение всей экспозиции (рис. 1). В тоже время она не остается постоянной, а периодически уменьшается и увеличивается, что особенно хорошо заметно в интервале от 0 до 24 часов экспозиции. При этом от 1 до 6 часов можно наблюдать угнетение активности фермента, достигающее своего минимального

значения. К 12 часам активность КФ возрастает, и значение ее становится таким же, как после 1 часа экспозиции. Последующие колебания активности КФ более плавны и также состоят в чередовании фаз ее снижения и повышения. Интересно, что и в контрольной группе животных, не испытывавших в течение экспозиции

токсического воздействия, активность КФ также не оставалась постоянной. Ее колебания отмечены нами в те же временные промежутки с той лишь разницей, что фазы снижения и повышения активности в контроле почти ни в одном случае не совпали с опытом (см. рис. 1).

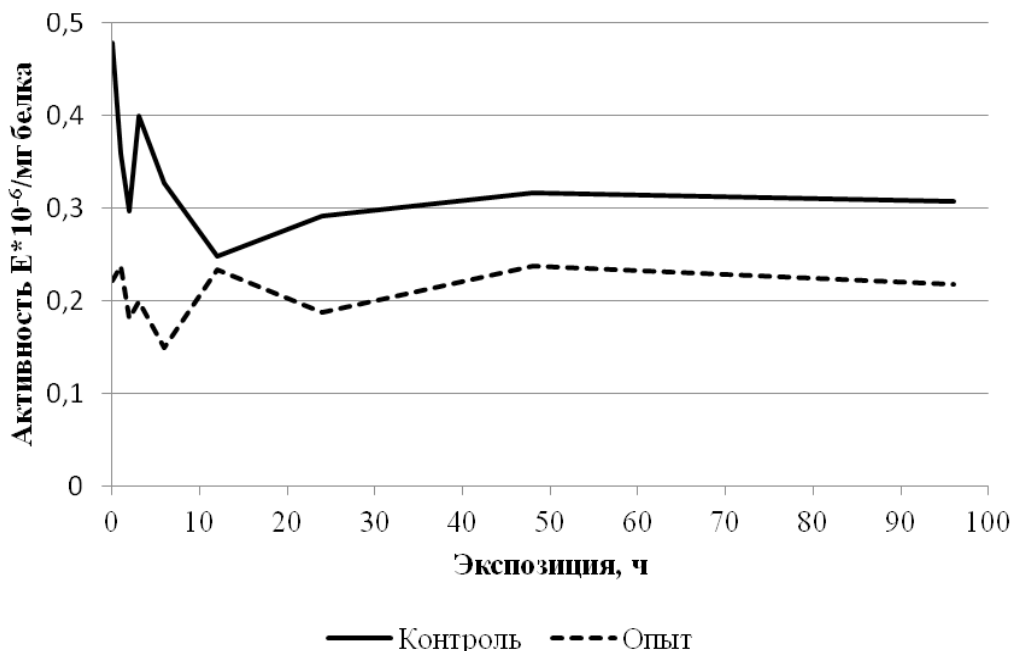


Рис. 1. Активность кислой фосфатазы в норме и при воздействии токсиканта.

Активность ДНКазы в течение экспозиции изменялась еще более непредсказуемо (рис. 2). Фазы повышения активности попеременно следовали за ее снижением как в опыте, так и в контроле, при этом в определенные моменты активность ДНКазы в опыте превышала контроль (через 6 и 48 ч экспозиции), в других случаях становилась ниже соответствующего контрольного значения (через 1–3, 12 и 96 ч экспозиции).

Еще одно отличие от реакции КФ состоит в том, что размах колебаний активности ДНКазы в опыте относительно контроля гораздо более значителен и достигает 12-кратного, тогда как аналогичный разброс значений активности КФ составляет не более 2,5 раз. Однако в контексте настоящей работы это наблюдение представляется менее существенным, поскольку может объясняться индивидуальными

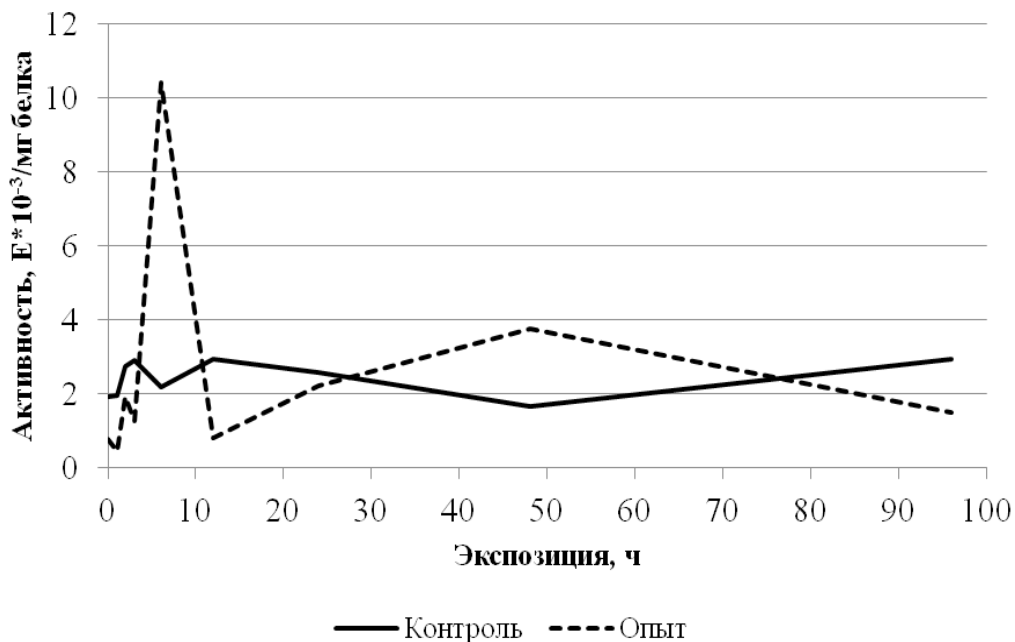


Рис. 2. Активность ДНКазы в норме и при воздействии токсиканта.

особенностями регуляции активности КФ и ДНКазы или их различной чувствительностью к токсиканту. Значительно большее впечатление производит сходство колебательной динамики активности этих ферментов, наблюдаемое и в опыте, и в контроле.

Ранее нами уже получены многочисленные свидетельства о существовании колебаний активности ферментов при токсическом воздействии на организм у целого ряда видов животных различных систематических групп (черви, моллюски, рыбы) [9], а также обобщены аналогичные литературные данные об изменении активности ферментов в острых токсикологических экспериментах [7], однако систематические колебания активности ферментов у контрольной группы подопытных животных обнаружены нами впервые.

Сразу укажем на то, что данные ко-

лебания не имеют ничего общего с уже известными суточными (циркадными) ритмами и другими, более масштабными циклическими процессами в организме именно в силу своей скоротечности – стадии увеличения и снижения активности ферментов сменяют друг друга за время от 1 до нескольких часов. Случайными значения активности КФ и ДНКазы также не являются, т.к. обнаружены они не у отдельных животных, а в их репрезентативных группах (численность репрезентативной группы для живородки речной, равная 6 шт. особей, была нами экспериментально обоснована ранее [6]).

Можно предположить, что постоянные изменения активности ферментов, приобретающие форму колебательной зависимости от времени наблюдений, имеют общебиологическую природу и представляют собой отражение динамического состояния живых систем,

характеризуемое как «устойчивое неравновесие» [1]. Скорее всего, именно это состояние само по себе является причиной всех колебательных процессов в живых организмах, которые постоянно происходят в норме, сопровождают срочную адаптацию к острому сублетальному токсическому или другому неблагоприятному воздействию, а впоследствии приобретают характер более глобальных циклических изменений активности, происходящих на уровне целого организма, таких, например, как циркадные ритмы.

Дальнейшее исследование природы и механизмов циклических колебаний активности ферментов в норме и в состоянии стресса нам представляется чрезвычайно интересным и перспективным, поскольку может помочь раскрыть не только сущность адаптации организма, но так же и саму основу существования живых систем, парадоксальность которой является ключевой проблемой всех естественных наук, остающейся пока совершенно не разрешенной.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Бауэр Э. Теоретическая биология. – М.-Л.: ВИЭМ, 1935. – 206 с.
2. Богдановский Г. А. Химическая экология: учебное пособие. – М.: МГУ, 1994. – 237 с.
3. Брагинский Л.П., Щербань Э.П. Острая токсичность металлов для водных беспозвоночных при различных температурных условиях // Гидробиол. журнал. – 1978. – Т. 14, № 6. – С. 86-92.
4. Вредные химические вещества (неорганические соединения V-VIII групп): справ. изд. / под ред. В.А. Филова и др. – Л.: Химия, 1989. – 592 с.
5. Мур Дж.В., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах. – М.: Мир, 1987. – 286 с.
6. Цветков И.Л. Биохимический аспект реакции гидробионтов на интоксикацию. – Saarbrücken: Lambert Academic Publishing GmbH & Co. KG, 2011. – 321 с.
7. Цветков И.Л., Коничев А.С. Биохимические и молекулярно-биологические аспекты адаптации гидробионтов. – М.: МГОУ, 2013. – 122 с.
8. Цветков И.Л., Поликарпова Л.В., Коничев А.С. Новый метод количественного определения активности дезоксирибонуклеазы с использованием флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов в качестве субстрата // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. 2012. № 3. С. 46-51.
9. 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.
10. 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.
11. 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.