

УДК 574.64 + 577.1

И. Л. Цветков, А. П. Попов, А. С. Коничев

**АКТИВНОСТЬ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ И
ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЫ У ГИДРОБИОНТОВ ПОД
ВЛИЯНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ
ВОДНОЙ СРЕДЫ**

Исследованы изменения активности кислой фосфатазы у гидробионтов разных систематических групп и ДНКазы у живородки речной в ответ на острую интоксикацию тяжелыми металлами, бензином и фенолом. В динамике токсического воздействия активность ферментов периодически колебалась относительно контрольных величин. Показано, что фазная форма кривой активности исследованных ферментов в остром опыте в целом единообразна, независимо от вида животного и использованного токсиканта. Предполагается, что динамика ферментативной активности, обусловленная интоксикацией *in vivo*, является биохимической составляющей неспецифического адаптационного синдрома гидробионтов и представляет собой объективную основу для определения совокупного токсического загрязнения вод.

Ключевые слова: экологическая биохимия гидробионтов, метаболическая адаптация, токсическое воздействие, стресс-реакция, неспецифический адаптационный синдром.

Изменению активности ферментов при интоксикации организма посвящено огромное количество публикаций. Немалая их часть относится к ферментам детоксикации, в частности цитохромам P₄₅₀, активность которых индуцируют сами ксенобиотики, взаимодействуя с определенными цитоплазматическими рецепторами и запуская механизмы биосинтеза соответствующих монооксигеназ [17]. Другая часть работ касается ферментов, непосредственно не задействованных в детоксикации, но участвующих в основных биохимических превращениях, таких как гликолиз или цикл Кребса, а также в функционировании субклеточных структур, в частности лизосомального аппарата — высокочувствительного и универсального биомаркера загрязнения среды обитания [17, 19]. Биохимическая роль этих ферментов в адаптации к токсическим веществам (в том числе неметаболизируемым) окончательно неясна, возможно, изменения их активности при интоксикации организма происходят по единому в живой природе механизму, формируя целый комплекс неспецифических реакций, возникающих в ответ на различные травмирующие воздействия — так называемый неспецифический адаптационный синдром [2, 7, 11].

© Цветков И. Л., Попов А. П., Коничев А. С., 2012

В предыдущих работах изучали ферментативную активность гидролаз как тест-функций для биохимического тестирования качества вод. При этом неоднократно наблюдали высокую изменчивость кислой фосфатазы, ДНКазы и протаз у разных видов гидробионтов на острую интоксикацию тяжелыми металлами, органическими веществами и их природными и искусственными смесями, такими как бензин, бытовые моющие средства, сточные воды [9, 10, 15, 18, 19]. Настоящее исследование посвящено изучению изменений функциональной активности ферментов в динамике токсического воздействия. Полученные данные рассмотрены в контексте концепции общего адаптационного синдрома.

Материал и методика исследований. Объектами исследований служили цериодафния *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg, улитковая пиявка *Glossiphonia complanata* L., малоцетинковые черви *Limnodrilus hoffmeisteri* Claparède и *Tubifex newaensis* Michaelsen, моллюски беззубка *Anodonta stagnalis* Gmelin и живородка речная *Viviparus viviparus* L., рыбы плотва обыкновенная *Rutilus rutilus* L. и ротан-головешка *Percottus glehni* Dybowski — типичные представители пресноводной фауны средней полосы России, которых отбирали в р. Вязь (пос. Тишково Московской обл.) и р. Которосль (г. Ярославль). Для акклимации к лабораторным условиям животных в течение 1—3 мес содержали в аквариумах объемом 60 л (дафнии, черви, моллюски) и 250 л (рыбы) при температуре 15—17°C, умеренном освещении естественным светом, круглосуточной аэрации и еженедельной замене 1/3—1/10 объема воды на отстоянную водопроводную. В аквариумах постоянно находились высшие водные растения, мелкий животный и растительный планктон. Рыбам дополнительно давали искусственный корм. В токсикологическом эксперименте животных группами пересаживали в сосуды с раствором исследуемого вещества (хлориды кадмия (II), меди (II), цинка (II), сульфат меди (II), фенол, бензин), приготовленным на аквариумной воде, с конечной концентрацией 0,1—10,0 ПДК для водоемов рыбохозяйственного назначения [8], выдерживали от 2 до 96 ч, после чего немедленно препарировали.

Для биохимического анализа из тел исследуемых животных (дафнии, черви) или их отдельных органов (моллюски, рыбы) готовили экстракты водорастворимых белков. Для этого материал гомогенизировали в фарфоровых ступках на холоде с пятикратным объемом экстрагирующего солевого раствора (0,15 М NaCl, 1 мМ ЭДТА×Na₂, pH 7,5) и центрифугировали при 10 000 g и 4°C в течение 20 мин для отделения нерастворившегося осадка. Полученные экстракты хранили в замороженном виде при –18°C. Активность ферментов определяли спектрофотометрически, предварительно разбавляя полученные экстракты экстрагирующим раствором в 10—40 раз (оптимизировали для определенного фермента и каждого вида подопытных животных). Концентрацию белка в экстрактах определяли методом Лоури [21].

Активность кислой фосфатазы определяли с *p*-нитрофенилфосфатом в качестве субстрата по приросту *p*-нитрофенола в инкубационной смеси. Для этого 100 мкл разбавленного экстракта белка инкубировали с 1,5 мМ *p*-нитрофенилфосфата (динатриевая соль) в 1,4 мл 50 мМ ацетатного буфера (pH 4,7) в течение 20 мин при 37°C. Реакцию останавливали прибавлением

2 мл охлаждённого 0,1 М NaOH. Оптическую плотность раствора измеряли при 415 нм относительно контроля, в который экстракт белка был добавлен после раствора щелочи. Количество образовавшегося в ходе реакции *p*-нитрофенола рассчитывали по калибровочной кривой [15, 20]. За единицу активности (*E*) принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль *p*-нитрофенола за 1 минуту.

Активность ДНКазы определяли по накоплению низкомолекулярных продуктов гидролиза денатурированной ДНК из эритроцитов цыпленка. Для этого 100 мкл неразбавленного экстракта белка инкубировали с 0,1 мл 0,3%-ного раствора субстрата в 0,8 мл 50 мМ ацетатного буфера (рН 4,7) в течение 60 мин при 37°C. Реакцию останавливали охлаждением реакционной смеси до 0°C. Негидролизованную ДНК осаждали прибавлением 2 мл 5%-ной хлорной кислоты. Пробы выдерживали 20 мин при 0°C для формирования осадка, который отделяли центрифугированием при 8 000 г в течение 15 мин. Оптическую плотность супернатанта измеряли при 260 нм относительно контроля, в который экстракт белков вносили после осаждения ДНК [9, 22]. За единицу активности (*E*) принимали такое количество фермента, которое вызывало прирост оптической плотности на 1 единицу за 1 час.

Все измерения проводили в 3—6 повторностях, статистическую достоверность результатов оценивали методом Стьюдента с вероятностью 0,95. Изменение ферментативной активности у животных опытных групп устанавливали по отношению к контрольным и выражали в процентах, за ноль принимали среднее значение активности ферментов в контрольной группе подопытных животных.

Результаты исследований

Активность исследуемых ферментов в ходе токсикологических экспериментов претерпевала определенные изменения у животных как опытных, так и контрольных групп. Однако размах этих изменений у опытных животных был существенно больше, а величины отклонений активности от контроля в опытах у большинства исследованных объектов намного превосходили наблюдавшиеся в контроле. Примером могут служить данные об активности кислой фосфатазы у беззубок, подвергнутых воздействию тяжелых металлов (таблица).

Из приведенных данных видно, что предельное снижение активности кислой фосфатазы, наблюдавшееся через 4 и 48 ч экспозиции, и максимальное ее повышение через 12 и 96 ч совпадают для контроля и всех вариантов опыта. В то же время на эти же периоды приходится соответственно минимумы и максимумы активности кислой фосфатазы в опытных вариантах относительно контроля.

Наличие колебаний активности ферментов у контрольных животных несколько затрудняло проведение исследований, так как контрольную группу нельзя было проанализировать однократно, ее требовалось отбирать вместе с опытными животными каждый раз по истечении очередной экспозиции.

Изменение активности кислой фосфатазы у беззубки при воздействии тяжелых металлов

Экспозиция, ч	Активность кислой фосфатазы, Е·10 ⁻³ /мг белка				
	контроль	0,005 мг Cd ²⁺ /мл	0,05 мг Cd ²⁺ /мл	0,01 мг Zn ²⁺ /мл	0,1 мг Zn ²⁺ /мл
2	8,11 ± 0,41	6,73 ± 0,40 (+)	5,76 ± 0,35 (+)	7,22 ± 0,36 (-)	7,46 ± 0,45 (-)
4	7,42 ± 0,29	4,97 ± 0,20 (+)	3,04 ± 0,12 (+)	5,79 ± 0,23 (+)	4,89 ± 0,20 (+)
6	7,94 ± 0,47	8,58 ± 0,43 (-)	6,99 ± 0,21 (-)	8,18 ± 0,41 (-)	8,42 ± 0,34 (-)
9	9,11 ± 0,46	20,41 ± 0,82 (+)	23,87 ± 0,95 (+)	12,66 ± 0,38 (+)	20,86 ± 0,83 (+)
12	9,94 ± 0,60	41,45 ± 1,66 (+)	50,50 ± 1,51 (+)	36,58 ± 1,46 (+)	48,41 ± 1,45 (+)
18	9,63 ± 0,38	31,39 ± 1,57 (+)	36,49 ± 1,82 (+)	17,53 ± 0,70 (+)	19,74 ± 0,59 (+)
24	8,73 ± 0,44	8,29 ± 0,33 (-)	7,42 ± 0,29 (+)	8,38 ± 0,36 (-)	8,12 ± 0,32 (-)
48	7,53 ± 0,37	5,87 ± 0,35 (+)	3,84 ± 0,19 (+)	6,25 ± 0,19 (+)	6,02 ± 0,18 (+)
72	8,92 ± 0,54	16,32 ± 0,82 (+)	18,91 ± 0,76 (+)	15,61 ± 0,62 (+)	16,86 ± 0,51 (+)
96	10,05 ± 0,61	31,86 ± 1,27 (+)	43,62 ± 1,31 (+)	26,83 ± 1,07 (+)	39,99 ± 1,60 (+)

Пр и м е ч а н и е. Представлены средние значения и стандартные ошибки ($x \pm S$); отклонения в опыте от контроля статистически достоверны (+) или недостоверны (-) с вероятностью $p \geq 0,95$.

Учитывая колебательный характер метаболических процессов, для представления большинства полученных результатов мы использовали относительные величины отклонения ферментативной активности от контроля (разницу между контролем и опытом, выраженную в процентах).

В воде с относительно высокой концентрацией ионов кадмия и меди (0,01—0,05 мг-ион/л, т. е. 10 ПДК_{рыбохоз} [8]), цериодафния и черви *L. hoffmeisteri* и *T. newaensis* гибли уже через 6—12 ч, поэтому опыты на этих гидробионтах проводили с концентрацией токсических веществ в 10 раз более низкой, чем на других. Величины активности кислой фосфатазы у цериодафнии, определенные для большинства экспериментальных групп (по 25—30 особей), и, соответственно, изменения активности фермента в острых опытах оказались недостоверными из-за большого разброса даже в шести повторных экспериментах (данные не приводятся). Средняя ошибка биохимических измерений (концентрация белка и активность кислых гидролаз в экстрактах) для других исследованных гидробионтов составляла от

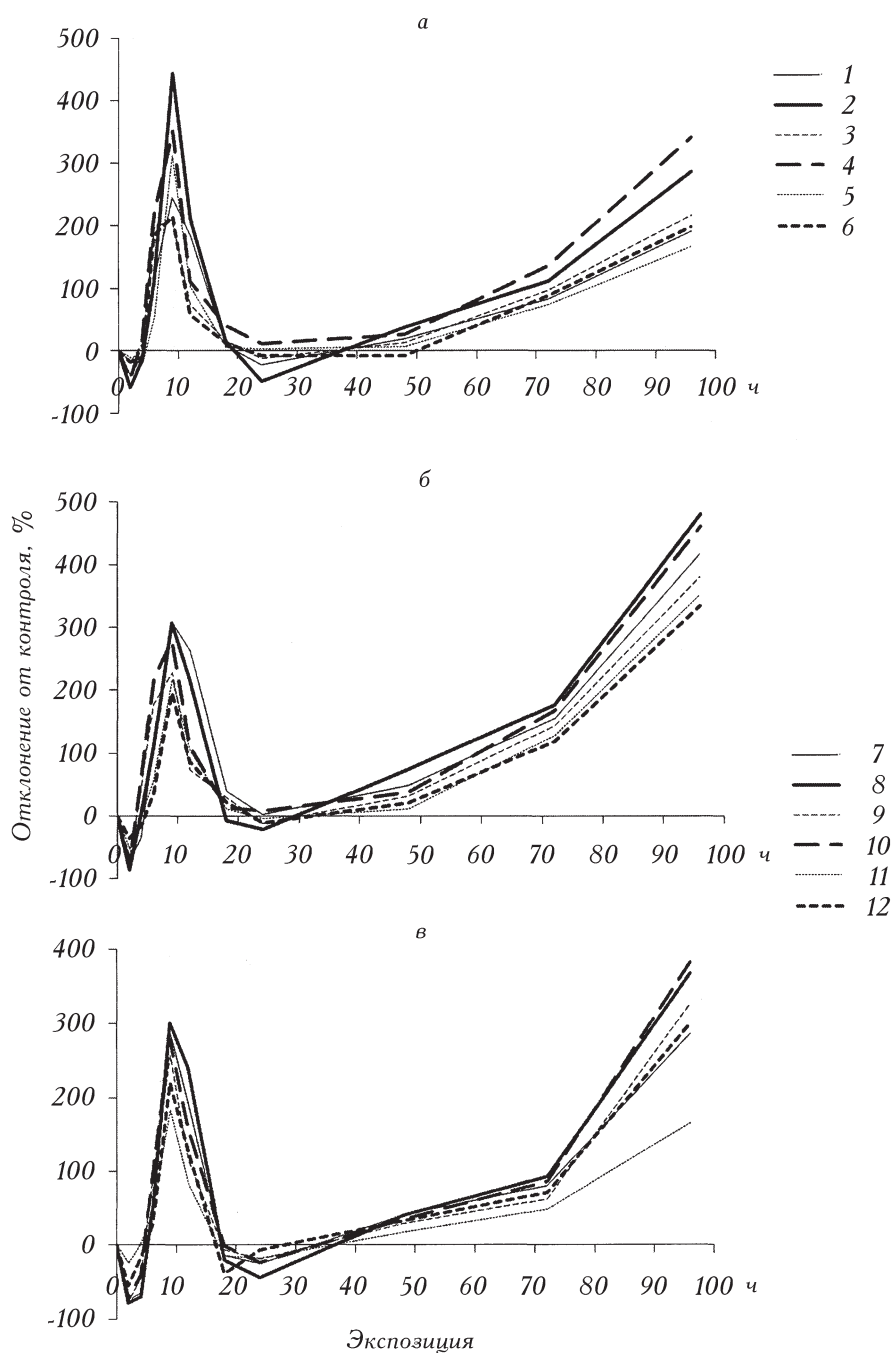
2,5% (рыбы) до 5,0% (черви, моллюски). Поэтому для формирования репрезентативной группы (минимальное количество особей в объединенной пробе, где нивелируется индивидуальная вариабельность биохимических показателей [13]), достаточно было взять соответственно от 3—5 до 5—7 особей. Для экспериментов с *L. hoffmeisteri* и *T. newaensis* использовали одновременно 15—20 особей.

Присутствие в среде катионов металлов вызывало у экспериментальных животных отчетливые модуляции активности кислой фосфатазы, состоявшие в регулярно сменяющих друг друга фазах ее повышения и понижения (по отношению к контролю). Наиболее выраженной реакцией кислой фосфатазы на действие металлов отличались кольчатые черви и моллюски, отклонения активности фермента от контроля у них часто превышали 100%. В частности, у червей после 2 ч экспозиции в среде с токсикантом происходило снижение активности кислой фосфатазы зачастую на несколько десятков процентов. Через 4 ч величина этого показателя приближалась к контролю, а уже через 9 ч резко увеличивалась и достигала 300—400%. За этим резким скачком следовал повторный цикл снижения и повышения активности, достигавший минимума через 18—24 ч и вновь превышавший контрольные значения через 48—96 ч (рис. 1, 2, а).

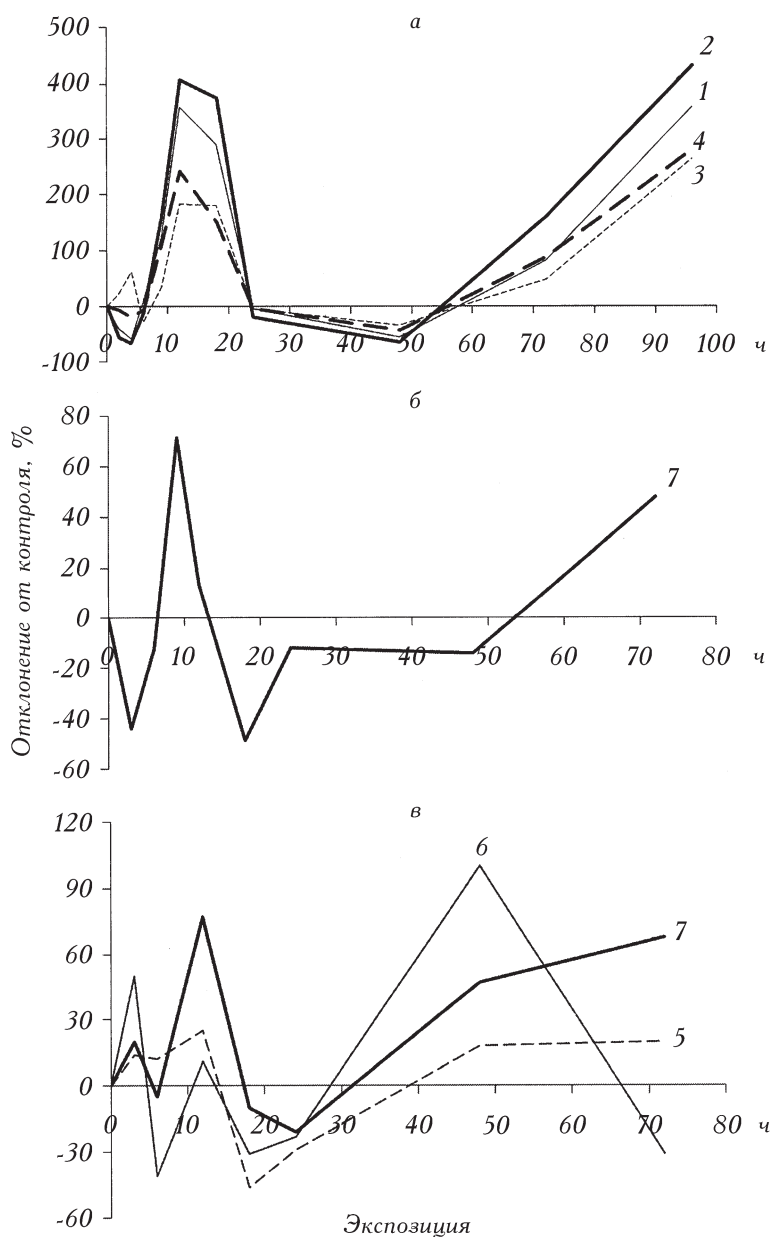
У моллюсков, подвергнутых воздействию тяжелых металлов, наблюдалась похожая динамика ферментативной активности. При этом амплитуда отклонений от контроля в целом оказалась практически такой же, несколько иным был лишь период колебаний. Первое снижение активности кислой фосфатазы в пищеварительной железе моллюсков происходило через 2—4 ч после начала эксперимента (за исключением опыта с медью концентрацией 0,001 мг-ион/л, действие которой стимулировало активность фермента у живородки речной). Максимум наблюдался через 12 ч, затем, через 24—48 ч, отмечено повторное снижение активности этого фермента, а через 72—96 ч она вновь возрастала.

У обоих видов рыб динамика ферментативной активности была выражена в наименьшей степени: до 24 ч экспозиции отклонения от контроля для кислой фосфатазы печени редко превышали 10%. Аналогичные данные для жабр, скелетных мышц и кишечника мы не приводим из-за незначительной зависимости от токсического воздействия. Однако, несмотря на сравнительно небольшие отклонения от контроля, закономерные колебания активности кислой фосфатазы выявляются также вполне отчетливо, а периодичность колебаний характеризуется меньшей, чем у беспозвоночных, экспозицией: минимумы активности кислой фосфатазы отмечены через 2, 12—18 и 48 ч, а максимумы — через 6, 24 и после 48 ч (рис. 3).

Реакция кислой фосфатазы животных на воздействие разных металлов и их концентрацию принципиально не различалась, кривые на рисунках, отражающие указанные зависимости, практически совпадали. В целом можно считать, что большая концентрация токсиканта вызывала более значительное отклонение активности фермента от контроля, среди использованных металлов наиболее выраженный эффект на исследованных животных оказывал Cd^{2+} .

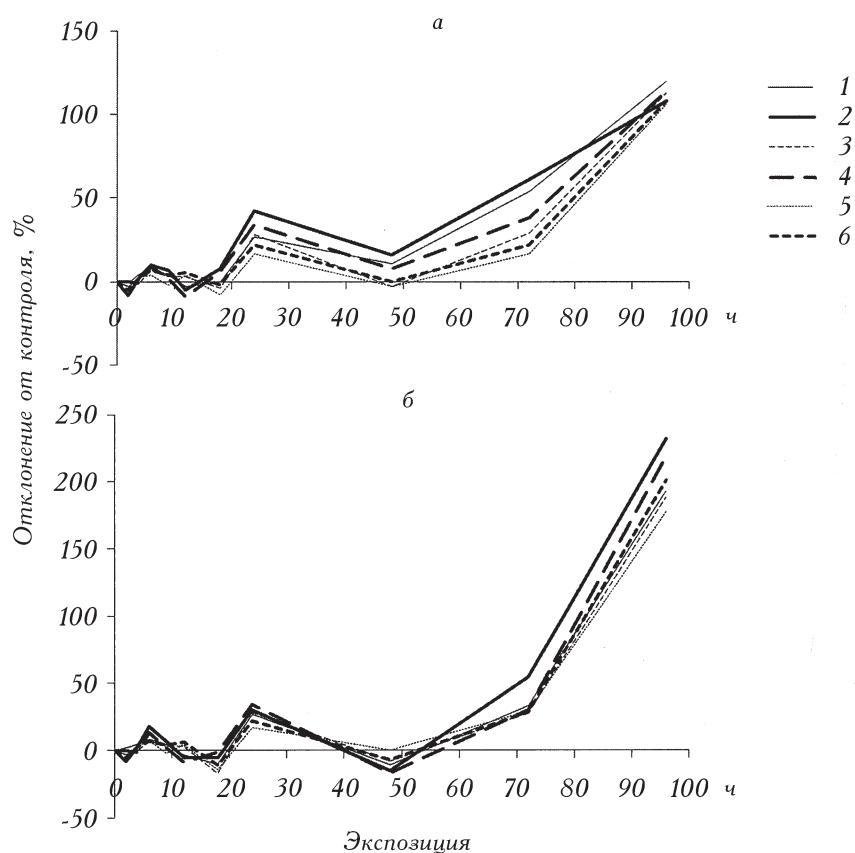


1. Динамика активности кислой фосфатазы кольчатых червей при воздействии тяжелых металлов: а — *Glossiphonia complanata* (1, 2 — Cd (0,005 и 0,05 мг/л); 3, 4 — Cu (0,001 и 0,01 мг/л); 5, 6 — Zn (0,01 и 0,1 мг/л)); б — *Limnodrilus hoffmeisteri*; в — *Tubifex newaensis* (7, 8 — Cd (0,0005 и 0,005 мг/л); 9, 10 — Cu (0,0001 и 0,001 мг/л); 11, 12 — Zn (0,001 и 0,01 мг/л)).



2. Динамика активности кислой фосфатазы пищеварительной железы моллюска *Viviparus viviparus* при воздействии токсикантов: а — тяжелые металлы (1, 2 — Cd (0,005 и 0,05 мг/л); 3, 4 — Cu (0,001 и 0,01 мг/л)); б — фенол; в — бензин (5 — 0,005 мг/л; 6 — 0,05 мг/л; 7 — 0,5 мг/л).

Динамика активности кислой фосфатазы в пищеварительной железе живородки речной при воздействии фенола и бензина несколько отличалась в каждом отдельном опыте. Воздействие фенола вызывало эффект, аналогичный токсичным металлам (рис. 2, б). Бензин, напротив, уже через 3 ч экспозиции, повышал активность фермента до 150%, через 6 ч — наблюдалось некоторое ее уменьшение от статистически недостоверного до 40%, че-



3. Динамика активности кислой фосфатазы печени рыб при воздействии тяжелых металлов: *а* — плотва; *б* — ротан; 1, 2 — Cd (0,005 и 0,05 мг/л); 3, 4 — Cu (0,001 и 0,01 мг/л); 5, 6 — Zn (0,01 и 0,1 мг/л).

рез 12 ч активность вновь возрастала на 10—80%, а через 18—24 ч — повторно снижалась на 10—45% (рис. 2, в). Таким образом, в отличие от использованных металлов и фенола бензин индуцировал дополнительную фазу увеличения активности кислой фосфатазы в первые 6 ч интоксикации. Спустя 12 ч динамика активности фермента в опытах с металлами, фенолом и бензином вновь становилась весьма сходной, т. е. природа токсического вещества уже не влияла на зависимость токсического эффекта от продолжительности воздействия.

Активность ДНКазы в пищеварительной железе живородки речной при интоксикации сульфатом меди (II) и бензином менялась в полном соответствии с установленной зависимостью (рис. 4).

Обсуждение результатов исследований

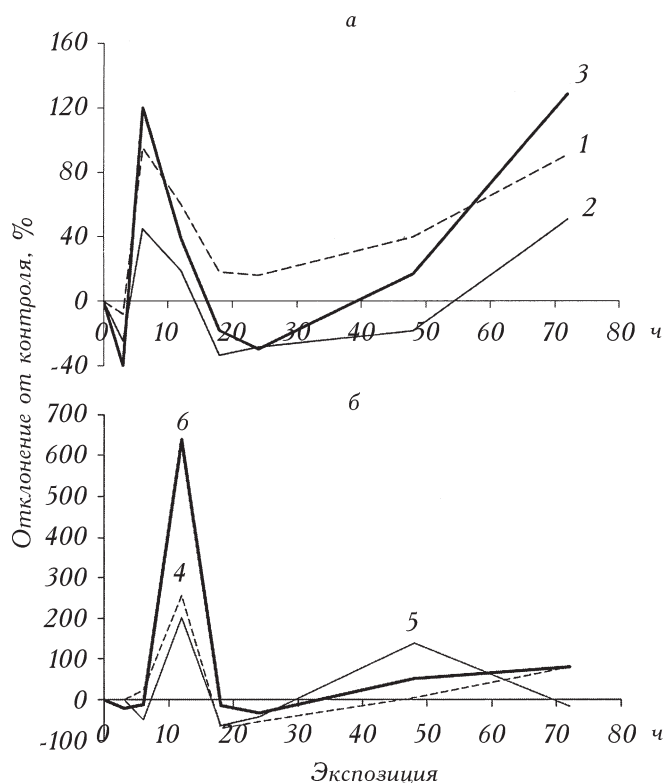
Повышенную чувствительность цериодафнии и кольчатых червей к токсическому воздействию тяжелых металлов мы связываем с более активным обменом веществ внешней и внутренней среды организма этих животных,

обусловленным их малыми размерами и высоким соотношением площади поверхности и объема тела. Цериодафния и червь *L. hoffmeisteri* общепризнанно отличаются низкой токсикорезистентностью и поэтому часто используются в качестве тест-организмов для традиционного биотестирования (по показателю выживаемости).

Особенности реакции кислой фосфатазы на интоксикацию у цериодафнии, рыб и кольчатых червей хорошо согласуются с полученными ранее данными в опытах на дафнии *Daphnia magna* Straus, молоди белого толстолобика *Hypophthalmichthys molitrix* Valenciennes, брюхоногих моллюсках

Planorbarius corneus L. и *Bithynia troscheli* Paasch [15] и могут быть интерпретированы как иллюстрация трех принципиально различных способов адаптации к стрессу. Первый способ — широкая индивидуальная изменчивость в сочетании с коротким жизненным циклом, позволяющий адаптироваться к неблагоприятным воздействиям преимущественно на уровне популяции (у дафнии и цериодафнии). Второй способ — поддержание постоянства внутренней среды на уровне организма благодаря развитой системе органов выделения токсических веществ во внешнюю среду, а также возможности избегания локальных загрязнений в водоемах путем активной миграции (у рыб). Третий способ — преимущественно биохимическая адаптация, реализуемая путем изменения параметров метаболизма (у моллюсков, малоцетинковых червей).

Мы не будем подробно останавливаться здесь на возможных причинах «предпочтения» гидробионтами того или иного способа, иначе говоря стратегии адаптации, тем более что они в основном хорошо известны [14]. Укажем только, что проявление биохимической адаптации в виде изменения активности кислой фосфатазы в большей или меньшей степени отмечено нами у всех исследованных объектов. Более всего обращает на себя внима-



4. Динамика активности ДНКазы моллюска *Viviparus viviparus* при воздействии сульфата меди (а) и бензина (б): 1 — 0,001 мг/л; 2 — 0,01 мг/л; 3 — 0,1 мг/л; 4 — 0,005 мг/л; 5 — 0,05 мг/л; 6 — 0,5 мг/л.

ние единообразие кривых зависимости ферментативной активности от продолжительности токсического воздействия у животных разных систематических групп. Так, в первые часы опыта происходит выраженное угнетение активности кислой фосфатазы, затем наблюдается ее рост (особенно хорошо заметный у беспозвоночных), сменяющийся повторным падением активности до контрольных значений или ниже; дальнейшее воздействие приводит к формированию еще одного (черви, моллюски) или двух (рыбы) пиков активности.

К настоящему времени показано, что организм и животных, и растений под действием самых разных стрессоров переходит в особое состояние — так называемый общий (или неспецифический) адаптационный синдром, развивающийся в несколько однотипных стадий: угнетение («реакция тревоги», «затаивание», «парадоксальный эффект»), стимуляция и повторное угнетение жизненных функций [3, 7, 11]. Наблюдаемые нами изменения активности кислой фосфатазы при воздействии разных металлов у семи видов гидробионтов также имеют фазный характер и предположительно реализуют неспецифические компенсаторные модуляции метаболизма, происходящие в состоянии стресса, иначе говоря, участвуют в реализации механизма биохимической адаптации.

У одного из подопытных животных — живородки речной мы изучили другие примеры стресс-индуцированных ферментативных реакций. Выяснилось, что динамика активности кислой фосфатазы и ДНКазы под влиянием разных токсических веществ в общих чертах совпадает с ранее полученными результатами. Так, отсутствие фазы угнетения активности кислой фосфатазы при воздействии низкой концентрации ионов Cu^{2+} имеет место и в опыте с бензином — через 3 ч фермент активируется на 14—50%. Для ДНКазы первая фаза угнетения при воздействии бензина оказалась слабо выражена — через 3 ч отклонения от контроля незначительны. В литературе также есть указания на то, что первая фаза адаптации в отдельных случаях может быть выражена слабо или совсем отсутствовать, что объясняют различной степенью генетически обусловленной устойчивости к стрессору и функциональным состоянием организма [3]. Вторая и третья фазы биохимической адаптации у живородки речной — стимуляция и повторное угнетение активности ДНКазы — выявлены нами практически во всех опытах, что полностью соответствует метаболической реакции других гидробионтов (двустворчатые моллюски, кольчатые черви, рыбы) на воздействие тяжелых металлов.

Следом за третьей фазой во всех опытах наблюдаются уже не столь закономерные, но все же регулярные и иногда довольно значительные колебания ферментативной активности, особенно выраженные у кислой фосфатазы. Интересно отметить, что кислая фосфатаза рыб, в отличие от беспозвоночных, в течение острого опыта претерпевает еще один полный цикл активации и повторного угнетения (через 18—48 ч) и затем вновь активируется (через 72 ч). Кроме того, в ряде случаев варьирует также и момент формирования фаз адаптации (чаще всего второй). Например, у живородки речной первый пик активности ДНКазы при воздействии сульфата меди и бензина отмечен соответственно спустя 6 и 12 ч экспозиции, кислая фосфатаза акти-

вируется при воздействии фенола через 9 ч, а тяжелых металлов — через 12 ч. У двух видов червей динамика активности кислой фосфатазы при интоксикации тяжелыми металлами идентична и сходна с моллюсками, за исключением того, что наибольшая активность фермента наблюдается через 9 ч экспозиции. Вероятно, частота и амплитуда колебаний определяются динамическими процессами в организме, различными у разных животных (особенно у рыб и моллюсков), но также зависят от природы и концентрации токсиканта, в общем смысле — от интенсивности токсического воздействия, что несколько не противоречит общепринятым представлениям о неспецифическом адаптационном синдроме [2, 3, 7, 11].

Таким образом, из полученных данных следует существование единой формы биохимического ответа на острую интоксикацию как элемента неспецифической биохимической адаптации организма к токсическому воздействию, одним из проявлений которого являются закономерные колебания активности ферментов, непосредственно не участвующих в детоксикации организма. Результирующая форма биохимического ответа изученных видов на токсическое воздействие в целом совпадает с «классической» колебательной зависимостью, которая была проиллюстрирована ранее физиологическими, двигательными, поведенческими и другими реакциями водных животных [3, 12].

Биохимические механизмы реализации неспецифического адаптационного синдрома еще предстоит изучить. В литературе пока представлены только отдельные наблюдения, разрозненные и недостаточные для систематизации и обобщения. Чаще всего обращают внимание на сам факт изменения активности какого-либо фермента в стрессовом состоянии, реже характеризуют связь прироста активности с субклеточной локализацией и практически не исследуют индуцированные внешним воздействием изменения в качественном составе у полиморфных ферментов. В предыдущих работах мы исследовали реакцию комплекса кислых фосфатаз живородки речной при воздействии $0,01 \text{ мг Cd}^{2+}/\text{л}$ в течение 72 ч и выявили некоторые способы «настройки» метаболизма в состоянии стресса. Суммарная активность комплекса кислых фосфатаз в этом опыте увеличилась более чем на 100%, тогда как активность отдельных форм фермента при этом менялась разнонаправленно. Большинство фосфатаз, а именно КФ 1, КФ 2, КФ 4, КФ 5, а также индуцированная в опыте стресс-специфичная КФ 6 в опыте активировались. Эти фосфатазы активно гидролизуют различные фосфорилированные углеводы и глицерофосфат, тормозя тем самым протекание гликолиза и способствуя накоплению в клетках и тканях свободных углеводов или их производных — сорбита и глицерина. Напротив, КФ 3, специфичная к аденозиндифосфату и способная стимулировать гликолиз посредством АМФ-зависимой гликогенфосфорилазы, у моллюсков опытной группы оказалась неактивна [16, 18]. Выявленные изменения должны приводить к снижению уровня энергетического обмена в целом, что является одним из системных признаков стресса [1, 4, 5]. Вполне вероятно, что и ДНКаза, как и другие полиморфные ферменты, не имеющие жесткой метаболической специализации, также характеризуется определенными функциональными особенностями, которые проявляются в состоянии стресса и позволяют организму адаптироваться к неблагоприятным условиям среды.

Поскольку динамика активности кислой фосфатазы и ДНКазы в остром токсикологическом опыте является одним из проявлений неспецифического адаптационного синдрома, достоверное отклонение величин ферментативной активности экспериментальных животных от контроля может свидетельствовать о присутствии в воде токсических веществ в концентрации, представляющей опасность для их жизнедеятельности, разумеется, если температура, освещенность, содержание кислорода, доступность пищи и прочие условия оптимальны. Использование этого биохимического показателя позволяет определять совокупное токсическое загрязнение воды уже при малых экспозициях (3—12 ч), причем выбор тест-функции и тест-объекта в определенной степени достаточно широк. Разумеется, не все ферменты характеризуются одинаково хорошо выраженной динамикой активности и не все гидробионты в равной степени удобны для биохимического тестирования качества воды: одни из-за неспособности к эффективной модуляции метаболизма (дафнии и, возможно, другие традиционные тест-организмы), другие — из-за слабой корреляции биохимических критериев их состояния с уровнем загрязнения воды (рыбы), третьи — вследствие технических сложностей отлова и определения (олигохеты). Однако такой показатель, как технологичность тестирования качества воды с помощью биохимических параметров, в любом случае остается высоким, поскольку для получения воспроизводимых результатов достаточно использовать акклимированных к лабораторным условиям животных, а точно определить искомую активность фермента позволяют качественные реагенты и правильно настроенное оборудование [6, 10].

Заключение

Интоксикация тяжелыми металлами индуцирует характерную динамику активности кислой фосфатазы и ДНКазы, однотипную для гидробионтов разных систематических групп (кольчатые черви, брюхоногие и двусторчатые моллюски, рыбы). Она представляет собой периодические флуктуации, повторяющие контрольные изменения, но происходящие с большей амплитудой. Эти флуктуации наблюдаются в течение кратковременного («острого») токсикологического эксперимента уже после 2—4 ч экспозиции и не имеют ничего общего с суточными («циркадными») ритмами обмена веществ у животных. Природа их заключается в адаптивных модуляциях метаболизма, которые составляют суть классической трехфазной адаптационной кривой («кривой Селье») и являются биохимическим элементом неспецифического адаптационного синдрома у гидробионтов.

Биохимические тест-функции, такие как общая активность кислой фосфатазы и ДНКазы у гидробионтов, отражают состояние организма опытных животных, подвергнутых острой сублетальной интоксикации, и могут характеризовать суммарное токсическое загрязнение воды.

**

Досліджено зміни активності кислої фосфатази у гідробіонтів різних систематичних груп та ДНКазу у молюска жайвородки річкової у відповідь на гостру інтоксикацію важкими металами, бензином і фенолом. Активність ферментів періодично знижувалась та зростала відносно контрольних величин. Форма кривої активності в цілому подібна у різних організмів та за дії різних токсикантів.

Припускається, що динаміка ферментативної активності є біохімічною складовою неспецифічного адапційного синдрому гідробіонтів і об'єктивною основою для визначення сукупного токсичного забруднення вод.

**

*The changes of activity of acid phosphatase of hydrobionts of different taxa and DNAse of the snail *Viviparus viviparus* L. as a response to acute intoxication caused by heavy metals, petrol and phenol were studied. Enzyme activity periodically changed depending on duration of the toxic effect. Shape of the curve of studied enzyme activity was similar in various under the impact of different species toxic agent. The dynamics the enzymatic activity is supposed to be a component nonspecific adaptation syndrome of hydrobionts. It could be a real basis for estimation of the combined toxic water pollution.*

**

1. Биргер Т.И. Метаболизм водных беспозвоночных в токсической среде. — Киев: Наук. думка, 1979. — 190 с.
2. Браун А.Д., Моженок Т.П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. — Л.: Наука, 1987. — 232 с.
3. Голиков А.Н., Голиков Н.В. Угнетение и стимуляция как фазы процесса адаптации // Тр. Зоол. ин-та АН СССР. — 1987. — Т. 160. — С. 4—12.
4. Горомосова С.А. Элементы углеводного обмена у мидий в норме и при воздействии ядов // Биологические основы борьбы с обрастанием. — Киев: Наук. думка, 1973. — С. 133—154.
5. Маляревская А.Я. Биохимические механизмы адаптации гидробионтов к токсическим веществам // Гидробиол. журн. — 1985. — Т. 21, № 3. — С. 70—82.
6. Пат. РФ № 2308719. Способ определения токсического загрязнения сточных и природных пресных вод / И.Л. Цветков, А.П. Попов, А.С. Коничев. — Оpubл. 20.10.2007. — Бюл. № 29.
7. Пахомова В.М. Основные положения современной теории стресса и неспецифический адаптационный синдром у растений // Цитология. — 1995. — Т. 37, № 1/2. — С. 66—91.
8. Перечень предельно допустимых концентраций и ориентировочно безопасных уровней воздействия вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоёмов / Комитет РФ по рыболовству. — М.: Мединор, 1995. — 220 с.
9. Попов А.П., Коничев А.С., Цветков И.Л. Влияние токсичных соединений техногенного происхождения на активность и множественные формы кислой ДНКазы живородки речной (*Viviparus viviparus* L.) // Прикл. биохимия и микробиология. — 2003. — Т. 39, № 5. — С. 518—523.
10. Попов А.П., Цветков И.Л., Коничев А.С. Биохимическое тестирование токсического загрязнения вод; планирование эксперимента и выбор тест-объекта // Вестн. МГОУ. Сер. Естественные науки. — 2006. — Вып. 4. — С. 87—92.
11. Селье Г. Стресс без дистресса. — М.: Прогресс, 1979. — 122 с.

12. Филенко О.Ф. Водная токсикология. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. — 154 с.
13. Хоружая Т.А. Перспективы использования биохимических тест-функций в биомониторинге пресных вод // Гидробиол. журн. — 1989. — Т. 25, № 5. — С. 47—52.
14. Хочачка П., Сомеро Д. Стратегия биохимической адаптации. — М.: Мир, 1977. — 398 с.
15. Цветков И.Л., Зарубин С.Л., Урванцева Г.А. и др. Кислая фосфатаза гидробионтов как фермент — индикатор биохимической адаптации к воздействию токсических веществ // Изв. РАН. Сер. биол. — 1997. — № 5. — С. 539—545.
16. Цветков И.Л., Коничев А.С. Стресс-индуцированная динамика сорбита и активности сопутствующих ферментов в пищеварительной железе живородки речной // Биохимия. — 2009. — Т. 74, вып. 11. — С. 1548—1554.
17. Цветков И.Л., Коничев А.С. Экологическая биохимия гидробионтов. — М.: Изд-во МГОУ, 2006. — 104 с.
18. Цветков И.Л., Попов А.П., Коничев А.С. Комплекс кислых фосфатаз живородки речной в норме и при интоксикации ионами кадмия // Биохимия. — 2003. — Т. 68, вып. 12. — С. 1648—1656.
19. Цветков И.Л., Цветкова М.А., Зарубин С.Л. и др. Оценка качества сточных и природных вод с помощью биохимического показателя — активности кислой фосфатазы пресноводных моллюсков // Вод. ресурсы. — 2006. — Т. 33, № 1. — С. 62—70.
20. Bessey O.A., Lowry O.H., Brock M.J. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum // J. Biol. Chem. — 1946. — Vol. 164, N 1. — P. 321—329.
21. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent // Ibid. — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
22. Razzel W., Khorana H. Studies on polynucleotides. X. Enzyme degradation. Some properties and mode of action of spleen phosphodiesterase // Ibid. — 1961. — Vol. 236, N 4. — P. 1144—1149.

Московский государственный
областной университет

Поступила 27.09.11