

В.И. Гидранович, А.А. Лесович

Активность фосфоглюкомутазы под действием нитрат-ионов в организме *Anodonta cygnea*

Применение химических препаратов в промышленности, в сельском хозяйстве и в быту может приводить к загрязнению окружающей среды, и в частности водных бассейнов, определенными химическими веществами, и эта проблема с каждым годом становится все более актуальной.

Пресноводные озера, которых в нашей республике насчитывается 10000, представляют собой отдельную функциональную единицу – пресноводную экосистему. В этой экосистеме, как и в любой другой, присутствуют четыре главных компонента: абиотические вещества, продуценты (автотрофы), консументы (гетеротрофы) и деструкторы (организмы, потребляющие детрит и редуценты, минерализующие органические вещества – бактерии и грибы). Между этими компонентами в разных по набору жизненных форм экосистемах прослеживается функциональная взаимосвязь в том, что энергия переходит от более высокого трофического уровня (автотрофного) к более низкому (гетеротрофному). При этом потоки энергии при переходе от одного трофического уровня к следующему всегда уменьшаются.

В противоположность энергии, переходящей в экосистеме от одного трофического уровня к другому, как правило, в одном направлении, химические вещества циркулируют между этими уровнями по биохимическим циклам, как, например, цикл азота и другие. Биомасса при переходе от одного трофического уровня к следующему, как правило, уменьшается. По этой причине в трофической цепи *первичные, вторичные и т.д. консументы* происходит концентрирование веществ, которое в определенных условиях может стать опасным для организма.

Нарушение одного из компонентов экосистемы, этапов потока энергии или биохимического цикла сопровождается нарушением всей экосистемы. Особенно наглядно действие физико-химических факторов среды на формирование экосистем озер. Так, в пресном водоеме первичная продукция достигает максимума на глубине 3 м. Органические соединения и ионы (NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) оседают вниз и в связи с резким снижением содержания кислорода восстанавливаются до NH_4 , S^{2-} и т.п.

В регионах с высоко развитой промышленностью и сельским хозяйством становится все труднее и проблематичнее сохранять стабильные саморегулирующиеся экосистемы, т.к. среда в условиях антропогенного воздействия испытывает все больший экологический стресс, в результате чего нарушается динамическое равновесие потока энергии и круговорота вещества. Экологические нагрузки ведут к снижению численности или вымиранию видов и обеднению биотопов. В этой связи перед охраной природы стоит очень важная и неотложная задача изучения антропогенной

угрозы экосистемам с целью предотвращения необратимого для природы экологического равновесия.

Химическое загрязнение водоемов заставляет представителей растений и животных определенным образом реагировать на изменение среды обитания. У представителей животного мира водоемов значительно уже круг адаптивных механизмов по сравнению с наземными животными, и главным механизмом выступает биохимическая адаптация, которая затрагивает глубинные стороны метаболизма.

В решении данной проблемы встает необходимость в научно обоснованных подходах на различных уровнях изучения реакций живых организмов на определенные химические соединения.

Биологический мониторинг как одно из направлений в системе охраны природы и в разработке природоохранных мероприятий, включающее биотестирование и биоиндикацию, требует изыскания биологических индикаторов загрязнения окружающей среды химическими соединениями и экспериментальной оценки влияния их на процессы жизнедеятельности. Определенную роль в решении данной проблемы может играть биологическое моделирование, которое позволяет варьировать в широких пределах химическими веществами, их сочетанием и концентрациями.

В целях биологического тестирования водных бассейнов могут использоваться водоросли, водные растения, моллюски, ракообразные, рыбы. Моллюски – самый богатый после членистоногих тип животных, насчитывающий 128000 видов, для подавляющего большинства которых местом обитания являются водоемы [1–4].

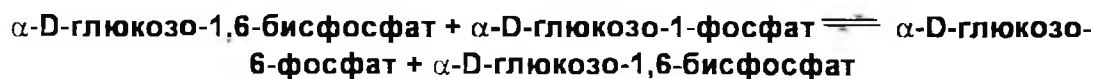
Двустворчатые моллюски являются весьма перспективными биологическими объектами для мониторинга и могут использоваться в целях биологического тестирования водоемов Белорусского Поозерья как биологические фильтраторы и в силу своего широкого распространения.

В последние годы особую опасность, наряду с другими факторами, занимает химическое загрязнение окружающей среды и, в частности, нитратами. В нашей зоне возможность загрязнения водных бассейнов нитратами связана с выносом из полей в бассейны рек и озер азотных удобрений и сточных вод из животноводческих ферм. Нитраты создают своеобразный экологический фон, и возрастание их уровня может быть небезопасным для животных и человека [2–5].

Токсичность соединений азота зависит от степени окисления и скорости окисления, с которой происходит процесс окисления до нитратов и восстановления до аммиака или ионов аммония. Нитрат-ионы проявляют самые сильные окислительные свойства, т.к. азот находится в высшей степени окисления (+5). Существует мнение, что нитрат-ионы в организме человека и животных не проявляют токсических свойств, а превращаются в нитрит-ионы, которые вступают во взаимодействие с гемоглобином и оксигемоглобином с образованием метгемоглобина и комплексов продуктов восстановления нитрит-ионов с гемоглобином, что нарушает транспортную функцию крови и способствует развитию гипоксии. Многие авторы считают, что одним из механизмов токсического действия нитратов является активация свободно-радикальных процессов в крови, имеются данные о взаимодействии нитрит-ионов с ферментами тканевого дыхания [5, 6].

Целью нашей работы являлось выяснение возможности оценки загрязнения водоемов нитратами по изменению каталитической активности и фосфолюкомутазы в различных органах и тканях пресноводного двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea* под действием нитрат-ионов для данного фермента.

Фосфоглюкомутаза (КФ 2.7.5.1, α -D-глюкозо-1,6-бисфосфат: α -D-глюкозо-1-фосфат фосфотрансфераза) впервые обнаружена в экстрактах дрожжей и тканей животных в 1938 году [7], а через 10 лет выделена в кристаллическом виде [8]. Фермент катализирует обратимую реакцию кажущегося внутримолекулярного переноса с регенерацией доноров по уравнению:



α -D-Глюкозо-1,6-бисфосфат в данной реакции выполняет роль кофермента. Считают, что реакция, катализируемая фосфоглюкомутазой, протекает с образованием промежуточного фермент-фосфатного комплекса по механизму двойного замещения с двумя стадиями переноса фосфорильной группы и фермент может быть в фосфорилированной и дефосфорилированной формах [9]. Фосфатная группа в фермент-фосфатном комплексе присоединяется к гидроксильной группе аминокислотного остатка серина и может быть присоединена к 6-й или 1-й гидроксильной группе глюкозофосфата.

При взаимодействии фермент-фосфатного комплекса с глюкозо-1-фосфатом последний этерифицируется в шестом положении, а образованием глюкозо-1,6-бисфосфата, который реагирует с нефосфорилированным ферментом с образованием глюкозо-6-фосфата и фермент-фосфатного комплекса. Фермент-фосфатный комплекс, вступая в реакцию с глюкозо-6-фосфатом, осуществляет этерификацию в первом положении, а образовавшийся глюкозо-1,6-бисфосфат реагирует со свободным ферментом и передает ему фосфатную группу в шестом положении, при этом образуется глюкозо-1-фосфат. Фосфорилированная форма фермента является неустойчивой и легко подвергается гидролизу. Свободный фермент фосфорилируется за счет глюкозо-1,6-бисфосфата. Образование глюкозо-1,6-бисфосфата обеспечивает фермент фосфоглюкокиназа, катализируя реакцию фосфорилирования глюкозо-1-фосфата за счет АТФ. В конечном итоге фосфоглюкомутаза катализирует обратимое превращение глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат.

С одной стороны, фосфоглюкомутаза обеспечивает превращение глюкозо-1-фосфата – продукта фосфорилазной реакции, образующегося в результате фосфорилитического расщепления гликогена, в глюкозо-6-фосфат и тем самым поставляет субстрат для окислительного пентозофосфатного пути и для глюкозофосфат-изомеразной реакции, обеспечивающей гликолиз и неокислительный пентозофосфатный путь метаболизма углеводов. С другой стороны, глюкозо-1-фосфат как продукт фосфоглюкомутазной реакции, образовавшийся из глюкозо-6-фосфата, может быть использован в биосинтезе гликогена и метаболическом пути уроновых кислот, от которого ведет к биосинтезу аскорбиновой кислоты.

Как видим, фосфоглюкомутаза находится на перекрестке различных путей метаболизма углеводов, что и определило выбор данного фермента в наших исследованиях.

Для выяснения поставленных задач проведено две серии экспериментальных исследований. В каждой серии исследований по принципу аналогов с учетом возраста и массы было подобрано пять групп животных. В первой серии опытов животные содержались в аквариумах 5 суток, а во второй – 10 суток. В каждой серии исследований была контрольная группа животных, которые находились в обычной воде. Четыре опытные группы моллюсков содержались в воде, в которую было внесено 5, 10, 20 и 50 ПДК нитрат-ионов, что соответствовало 250, 500, 1000 и 2500 мг $\text{NO}_3^-/\text{л}$.

Активность фосфоглюкомутазы определяли по методу Noltman и Bruns [10], результаты экспериментальных исследований обрабатывали методом вариационной статистики с использованием компьютерной программы.

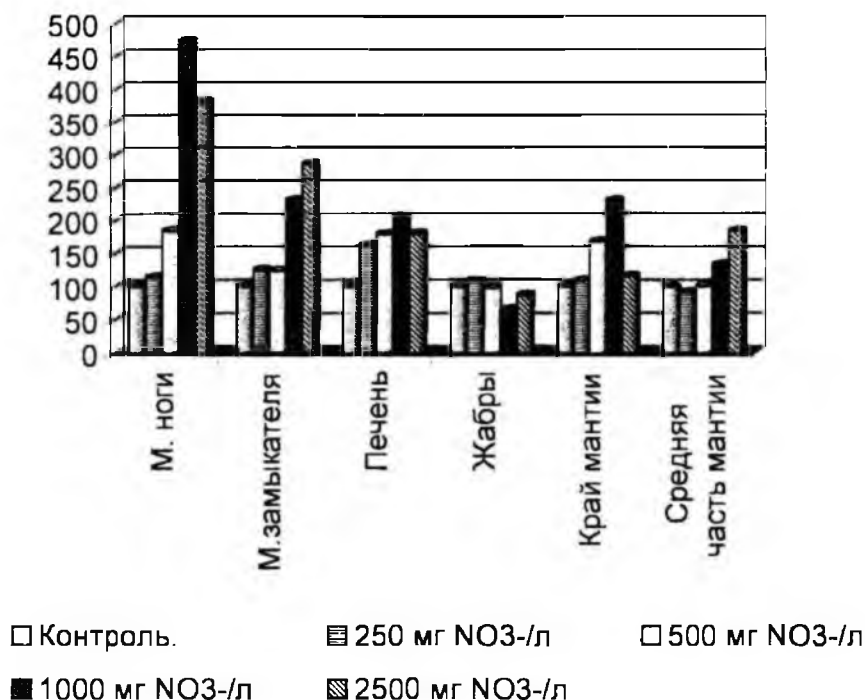


Рис. 1. Активность фосфоглюкомутазы в организме *Anodonta cygnea* под влиянием нитратов (в % к контролю), экспозиция 5 суток

Исследования показали (рис. 1), что нитраты в концентрации 250 мг/л через 5 суток незначительно повышают активность фосфоглюкомутазы в мышце ноги и замыкателя, в жаберных пластинках и в крае мантии и только в печени активность фермента возросла на 63% ($P < 0,01$). Нитраты в концентрации 500 мг/л оказывают более высокое стимулирующее действие на активность фермента в мышце ноги (85%, $P < 0,01$), печени (80%, $P < 0,05$) и крае мантии (69%, $P < 0,05$).

Повышение концентрации нитратов в воде до 1000 мг/л сопровождалось дальнейшим повышением активирующего действия фосфоглюкомутазы. Так, активность фермента повысилась в мышце ноги на 373% ($P < 0,001$), в мышце замыкателя на 132% ($P < 0,001$), в печени на 107% ($P < 0,05$), в крае мантии на 131% ($P < 0,01$). В жаберных пластинках наблюдалось ингибирование фосфоглюкомутазы, и ее активность составила 66% по отношению к активности контрольной группы ($P < 0,01$).

Под действием нитратов в концентрации 2500 мг/л в течение 5 суток возрастает стимуляция активности фосфоглюкомутазы в мышце замыкателя на 186% ($P < 0,001$), в средней части мантии на 85% ($P < 0,02$). В мышце ноги, в печени и в крае мантии стимулирующее действие нитратов снижается, но остается на достаточно высоком уровне в мышце ноги на 282% ($P < 0,001$), в печени на 81% ($P < 0,001$), и превышает активность фосфоглюкомутазы по сравнению с контрольной группой.

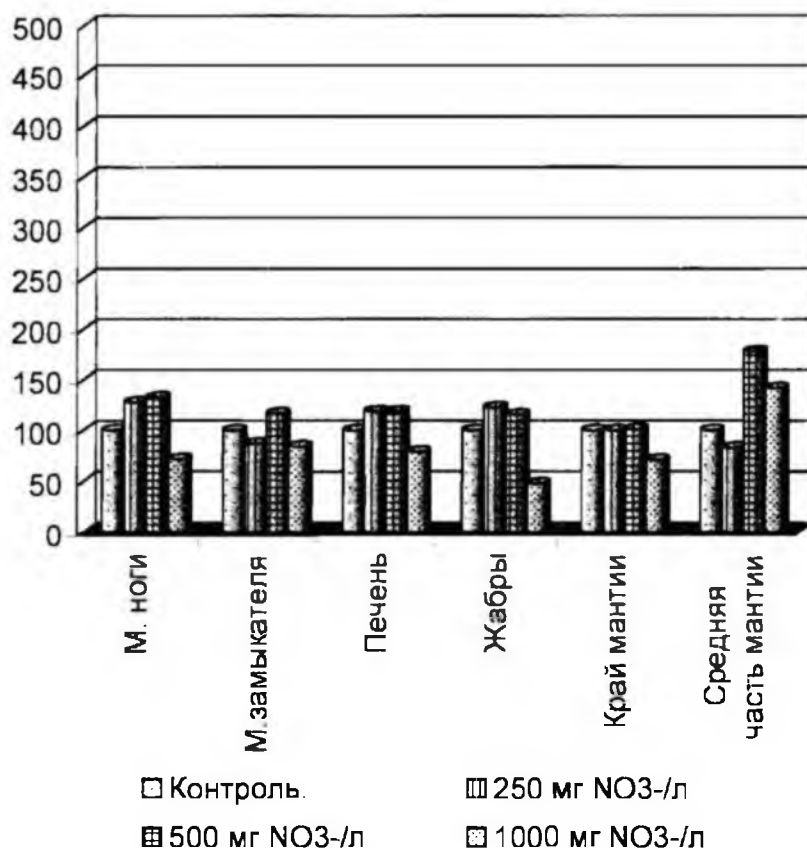


Рис. 2. Активность фосфоглюкомутазы в организме *Anodonta cugnea* под влиянием нитратов (в % к контролю), экспозиция 10 суток

Экспозиция моллюсков в течение 10 суток показала, что под действием нитратов в концентрации 250 мг/л достоверных изменений в активности фосфоглюкомутазы в изучаемых органах в этот период не наблюдалось.

Через 10 суток содержания моллюсков в воде при концентрации нитратов 500 мг/л активность фермента была несколько повышенной в мышце замыкателя, печени и жаберных пластинках (рис. 2). В средней части мантии повышение активности фосфоглюкомутазы составило 78% ($P < 0,05$), а в мышце ноги – 33% ($P < 0,005$).

В этот период исследований активность фосфоглюкомутазы под действием нитратов в концентрации 1000 мг/л снижалась во всех органах, за исключением средней части мантии. В мышце ноги, в мышце замыкателя, в печени и в крае мантии снижение активности было незначительным и статистически недостоверным, а в жаберных пластинках ингибирование фермента составило 52% ($P < 0,05$). В средней части мантии, наоборот, наблюдалось повышение активности фосфоглюкомутазы на 42% ($P < 0,05$).

Под действием нитратов в концентрации 2500 мг/л на 6–9-е сутки моллюски погибли и изучение активности фермента в данной ситуации требует проведения дополнительных исследований и методических подходов.

На основании полученных экспериментальных данных можно сделать заключение, что нитраты активируют фосфоглюкомутазу в организме *Anodonta cugnea*. Степень активирования зависит от концентрации нитратов и времени воздействия. Определение активности фосфоглюкомутазы в организме беззубки может быть использовано как один из показателей в оценке загрязнения водоемов нитратами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Жизнь животных*. В 6 т. Т. 2. Беспозвоночные / Под ред. **А.А. Зинкевича** – М., 1968. – 564 с.
2. **Калинкина М.Н.** Прогноз состояния гидробионтов при нарушении ионного состояния воды // *Экология*, 2002, № 1. – С. 81–84.
3. **Березина Н.А.** Влияние pH среды на пресноводных беспозвоночных в экспериментальных условиях // *Экология*, 2002, № 5. – С. 372–381.
4. **Данилин И.А., Сынзыныс Б.И., Козьмин Г.В., Рот Г.М.** Экспериментальное обоснование нового метода биотестирования пресноводных водоемов по содержанию металлотиионенинов в органах и тканях двустворчатых моллюсков // *Экология*, 2002, № 5. – С. 397–400.
5. **Гидранович Л.Г.** Химические аспекты механизма токсического действия нитратов и нитритов // Сб. научн. тр. к 40-летию фармацевтического факультета. – Витебск, 1999. – С. 213–220.
6. **Ажила Я.И., Реутов В.П., Каюшин Л.П.** Экологические и медико-биологические аспекты проблемы загрязнения окружающей среды нитратами и нитритами // *Физиология человека*, 1990, Т. 16, № 3. – С. 131–149.
7. **Cori G.T., Colowick S.P., Cori C.F.** The enzymatic conversion of glucose-1-phosphoric ester to 6-ester in tissue extracts // *J. Biol. Chem.*, 1938. – 124, № 2. – P. 543–555.
8. **Najjar V.A.** The isolation and properties of phosphoglucomutase // *J. Biol. Chem.*, 1948. – 175, № 1. – P. 181–290.
9. **Najjar V.A., Mc Coy E.** Mechanism of action of muscle and yeast phosphoglucomutase and suggested mechanism for yeast hexokinase // *Federat. Proc.*, 1958. – 17. – P. 1141.
10. *Клиническая ферментология* / Под ред. **Э. Щеклика**. – Варшава, 1966. – 491 с.

S U M M A R Y

It was stated in experimental investigation that nitrates activate phosphoglucomutase in Anodonta cygnea organism. The level of activation depends on the nitrates concentration and time of exposure. Phosphoglucomutase activity detection in Anodonta cygnea organism can be used in the monitoring nitrates pollution of natural ponds.